



Ana Teresa Silva Neves

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

Estudo da ação danificadora do 2,2'-Bipyridyl no DNA na presença de radiação UV

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Professora Doutora Maria de Fátima Raposo

Júri:

Presidente: Professor Doutor Mário António Basto Forjaz Secca

Arguente: Doutor Filipe dos Santos Folgosa

Vogais: Professora Doutora Maria de Fátima da Silva Campos Raposo



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Abril, 2014

Estudo da ação danificadora do 2,2'-Bipyridyl no DNA na presença de radiação UV

Copyright © Ana Teresa Silva Neves, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

“No meio de qualquer dificuldade encontra-se a oportunidade.”
Albert Einstein

Agradecimentos

Primeiramente quero agradecer à minha orientadora, a Professora Doutora Maria Raposo, pela paciência, todos os ensinamentos e compreensão. Sem a sua ajuda e orientação este trabalho não seria possível.

À Faculdade de Ciências e Tecnologia, na pessoa de todos os Professores e Funcionários que realmente me marcaram, por tudo o que aprendi, pelos conselhos e críticas que contribuíram para o meu desenvolvimento tanto académico como pessoal.

À linha 5 do CEFITEC, por me proporcionar todas as condições para a realização deste trabalho juntamente com todo o REQUIMTE/DQ pela disponibilização de laboratório e espectrofotómetros UV-Vis e FTIR essenciais para a obtenção de resultados.

Um agradecimento especial à Ana Rita Monteiro com quem tive o prazer de partilhar alguns momentos durante este processo, desejo-te a maior sorte do mundo e tudo de bom.

À minha Família - *Pai Mãe e Inês* - que me ajudaram e aturaram nos momentos menos bons durante estes anos e durante este processo. Posso ter mau feitio às vezes e até pouca paciência mas gosto muito de vocês! Ao resto da Família - *Avós, Tios e Primos* - porque sem esta base que me sustenta não seria a mesma. Obrigada por tudo!

Aos meus verdadeiros amigos, aqueles que sempre me apoiaram e em que posso confiar, porque é também graças a vocês que tudo isto foi possível. Aos de sempre, que apesar de não estarmos sempre juntos, têm um lugar especial no meu coração e aos que ganhei em todo o meu percurso de formação, porque sem vocês não teria sido e não é certamente a mesma coisa, obrigada pelos melhores anos da minha vida. Que continuaremos sempre juntos para o resto das nossas vidas.

Por último, um agradecimento especial a uma das melhores pessoas que conheço, ao João. Porque és a pessoa que mais confio e é o teu conforto e paciência que me ajudam nos momentos mais difíceis aliado à tua boa disposição contagiante. Sem ti não seria o que sou hoje, FELIZ!

Resumo

Em 2008, foram estimados no mundo, cerca de 12.7 milhões de novos casos de cancro e 7,6 milhões de mortes por cancro, sendo que 56% dos casos e 64% das mortes ocorreram nos países em desenvolvimento. Estes números indicam que é necessário se encontrar novos meios de combater este flagelo. Uma das possibilidades é encontrar moléculas intercalantes do ácido desoxirribonucleico (DNA) que se degradem na presença de radiação ou partículas carregadas de baixa energia que criem condições de induzir lesões no DNA, inibidoras da replicação e que portanto contribuam para a não proliferação de células cancerígenas. Assim, nesta dissertação analisou-se a influência do agente intercalante 2,2'-Bipyridyl do DNA em presença de radiação UV, 254 nm, na degradação do DNA. Os danos criados no DNA foram analisados pelas técnicas de espectroscopia de ultravioleta-visível e de infravermelho. Os resultados obtidos permitiram inferir que a cinética de degradação do DNA é mais eficiente na presença do composto 2,2'-Bipyridyl e que o ataque pelos produtos da decomposição do 2,2'-Bipyridyl é feito a todas as bases, embora com constantes características diferentes, sendo a ataque à guanina com uma constante de tempo maior. Estes resultados permitem concluir que este composto pode ser um possível candidato a indutor de lesões no DNA.

Palavras-chave: *ácido desoxirribonucleico, bipyridyl, radiação ultravioleta, FT-IR e UV-Vis*

Abstract

In 2008, approximately 12.7 million new cancer cases and 7.6 million cancer deaths were estimated in the world and 56% of cases and 64 % of deaths occurred in developing countries. These numbers indicate that it is necessary to find new ways to combat this scourge. One possibility is to find *deoxyribonucleic acid* (DNA) intercalating molecules which, in the presence of radiation or low energy charged particles beams, create conditions to induce lesions in DNA, inhibiting the replication and therefore do not contribute to the proliferation of cancer cells. In this work is analyzed the influence of the intercalating agent 2,2'- *Bipyridyl*, in presence of UV radiation, on the DNA degradation. The damage created in DNA is characterized by ultraviolet-visible and infrared spectroscopy. The obtained results allowed to conclude that the DNA degradation kinetics is more efficient in presence of the compound 2,2'-*Bipyridyl* being the attack done by the 2,2'-*Bipyridil* decomposition products made to all DNA bases, but with different constant characteristics, and the attack on the guanine with a larger time constant. These results suggest that this compound may be a possible candidate for inducing DNA lesions.

Keywords: *deoxyribonucleic acid, bipyridyl, UV, FT-IR and UV-Vis*

Índice

AGRADECIMENTOS.....	IX
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XIII
ÍNDICE	XV
ÍNDICE DE FIGURAS	XVII
ÍNDICE DE TABELAS	XIX
1. INTRODUÇÃO.....	25
2. EFEITO DA RADIAÇÃO NO DNA E DE INTERLANTES	27
2.1. MOLÉCULA DE DNA E RADIAÇÃO UV.....	27
2.2. TERAPIA FOTODINÂMICA E FOTOSSENSIBILIZADORES	30
2.3. INTERCALANTES.....	34
3. DESCRIÇÃO MÉTODO EXPERIMENTAL	36
3.1. MATERIAIS E MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS	36
a) 2,2'-Bipyridyl	36
b) Ácido desoxirribonucleico - DNA.....	36
3.2. FONTE DE IRRADIAÇÃO	37
3.3. CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS	38
3.3.1. Espectrofotometria de UV-Visível.....	38
3.3.2. Espectrofotometria de Infravermelho por transformada de Fourier	40
3.4. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	42
4. ANÁLISE DA CINÉTICA DE DANOS.....	44
4.1. CARACTERIZAÇÃO DE SOLUÇÕES DE DNA E 2,2- BIPYRIDYL	44
4.2. CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DE RADIAÇÃO UV	47
4.3. ANÁLISE DE DANOS CAUSADOS PELA RADIAÇÃO UV	49
4.4. CONCLUSÕES.....	50
5. CARACTERIZAÇÃO DE DANOS POR INFRAVERMELHO	52
5.1. CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DE IRRADIAÇÃO DE DNA E INTERCALANTE	52
5.2. CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DE IRRADIAÇÃO.	55
5.3. CONCLUSÕES	64
6. CONCLUSÃO.....	66
TRABALHOS FUTUROS	66
7. BIBLIOGRAFIA.....	68

Índice de Figuras

Figura 1 - Divisão da região Ultravioleta do espectro, salientando-se a banda de região de uma lâmpada de baixa pressão de Mercúrio. (12).....	28
Figura 2 - Espectros de Absorção das diferentes bases azotadas dos ácidos nucleicos. (11).....	29
Figura 3 - Estrutura química das bases purinas (adenina e guanina) e pirimidinas (citosina, timina e uracilo) (12).....	29
Figura 4 - Esquema explicativo dos Mecanismos Fotossensibilizadores	31
Figura 5 - Mecanismos de ação da radiação UV com Fotossensibilizadores	32
Figura 6 - Formação de dímero ciclobutano pirimidina (A); fotoprodutos 6,4—pirimidona-pirimidina e isômero de Dewar (B), a partir de bases pirimidínicas expostas à radiação UVC (adaptado de (88)).....	33
Figura 7 - Modelos de ligação ao DNA (A - Intercalação ; B-ligação electrostática ; C - Groove Binding) (adaptado de (40))	35
Figura 8 - Estrutura Química 2,2'-Bipyridyl.....	36
Figura 9 - Representação esquemática da molécula de DNA (a - Representação Geral e b - Pequeno Fragmento)	37
Figura 10 - Esquema do sistema ótico do espectrofotômetro UV-Vis. (Adaptada de (49)).....	40
Figura 11 - Esquema ilustrativo de um espectrofotômetro FTIR. (48).....	40
Figura 12 - Representação esquemática dos diferentes modos de vibração por estiramento (a) simétrico e (b) assimétrico; e por deformação (c) tesoura, (d) torção, (e) rotação e (f) balanço. (48).....	41
Figura 13 - Espectros de absorção na região do UV/Vis das soluções de a) DNA, b) 2,2'-Bipyridyl e c) [1:1](v/v) DNA + 2,2'- Bipyridyl	45
Figura 15 - Evolução dos espectros de absorção de a) DNA, b) 2,2-Bipyridyl e c) [1:1](v/v) DNA + 2,2'- Bipyridyl com o aumento do tempo de exposição à radiação UVC.	48
Figura 15 - Evolução dos picos de absorvância normalizada de a) 260nm e b) 280 nm com o aumento do tempo de exposição à radiação UV das três soluções 2,2'-Bipyridyl, DNA e [1:1](v/v)2,2'-Bipyridyl + DNA	49
Figura 16 - Espectros de absorção de infravermelho no intervalo de 900 a 1800 cm^{-1} de filmes preparados com soluções aquosas com irradiação de: a) DNA, b)2,2'-Bipyridil e c)[1:1] (v/v) DNA+2,2'-Bipyridyl.	53
Figura 17 - Espectros de absorção de infravermelho, no intervalo de 900 a 1800 cm^{-1} , de filmes de a) DNA e b) [1:1](v/v) DNA + 2,2'-Bipyridyl preparados a partir de soluções irradiadas durante intervalos de tempo diferentes.	55
Figura 18 - Espectros de absorção de infravermelho, no intervalo de 900 a 1400 cm^{-1} de filmes de a) DNA e b) [1:1](v/v)DNA+2,2'-Bipyridyl preparados a partir de soluções irradiadas durante intervalos de tempo diferentes.	57
Figura 19 - Evoluções do pico de 960 cm^{-1} dos espectros de absorção de infravermelho normalizados de filmes de a) DNA e b) [1:1](v/v) DNA + 2,2'-Bipyridyl preparados a partir de soluções irradiadas durante intervalos de tempo diferentes.	58
Figura 20 - Espectros de absorção de infravermelho normalizados, no intervalo de 980 a 1150 cm^{-1} , de filmes de a) DNA e b) [1:1](v/v) DNA + 2,2'-Bipyridyl preparados a partir de soluções irradiadas durante intervalos de tempo diferentes.	59
Figura 21 - Espectros de absorção de infravermelho normalizados, no intervalo de 1150 a 1300 cm^{-1} , de filmes de a) DNA e b) [1:1](v/v) DNA + 2,2'-Bipyridyl preparados a partir de soluções irradiadas durante intervalos de tempo diferentes.	61
Figura 22 -Espectros de absorção de infravermelho normalizados, no intervalo de 1250 a 1400 cm^{-1} , de filmes de a) DNA e b) [1:1](v/v) DNA + 2,2'-Bipyridyl preparados a partir de soluções irradiadas durante intervalos de tempo diferentes.	62
Figura 23 - Evolução do espectro no intervalo de número de onda de 1400 a 1800 cm^{-1} de filmes de a) DNA e b) [1:1](v/v) DNA + 2,2'-Bipyridyl preparados a partir de soluções irradiadas durante intervalos de tempo diferentes.	63

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1 - Transições eletrônicas associadas a regiões do espectro eletrônico.</i>	<i>39</i>
<i>Tabela 2 - Bandas características de um espectro de UV-Vis de DNA (51).....</i>	<i>46</i>
<i>Tabela 3 - Bandas características de um espectro de UV-Vis de 2,2'-Bipyridyl (52)</i>	<i>46</i>
<i>Tabela 4 - Bandas características de um espectro de UV-Vis da solução [1:1](v/v) DNA + 2,2-Bipyridyl</i>	<i>47</i>
<i>Tabela 5 - Tempo de decaimento obtidos a partir das exponenciais de adaptação de exponenciais traçadas aos resultados experimentais do espectro de 260nm e de 280 nm.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabela 6 - Principais bandas observadas no espectro de absorção na região do infravermelho de DNA e respectivas assinaturas espectrais (51) (54) (55) (56)</i>	<i>54</i>
<i>Tabela 7 - Principais bandas observadas no espectro de absorção na região do infravermelho de 2,2'-Bipyridyl e respectivas assinaturas espectrais (55) (56) (14).....</i>	<i>55</i>

Simbologia e Acrónimos

DNA	Ácido desoxirribonucleico
$^1\text{O}_2$	Oxigénio em estado singleto
6-4PPs	6-4 pirimidina-pirimidona
8-oxoG	7,8-dihidro-8-oxiguanina
A	Adenina
bipy	2,2'-Bipyridyl
C	Citosina
CaF_2	Fluoreto de cálcio
CEFITEC	Centro de Física e Inovação Tecnológica
CFC's	Clorofluorocarono
cm	Centimetro
CPD's	Cis-Syn-ciclobutano
D	Dose de Irradiação
DewarPPs	Isómeros de Dewar
ERO's	Espécies reativas de oxigénio
FCT-UNL	Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
G	Guanina
H_2O_2	Peróxido de hidrogénio
I	Irradiância
IV	Infravermelho
MB	Azul de Metileno
O_2	Oxigénio
O_2^*	Radical Anião Superóxido
OH	Radicais Hidroxilo
PDT	Photodynamic Therapy - Terapêutica Fotodinâmica
T_0	Estado Tripleto Fundamental
T_1	Estado Tripleto Excitado
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
α	Ângulo alfa
φ	Potência

1

Introdução

Watson e Crick determinaram a estrutura em dupla hélice do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*) e posteriormente a relação do DNA no controlo das funções celulares (1) inferindo-se assim o seu papel essencial no tratamento de doenças de origem genética como o cancro. Este, caracterizado pelo crescimento anormal de células, provoca um desequilíbrio entre a proliferação e a morte celular, evoluindo para uma população de células que pode invadir tecidos e metastizar à distância levando a uma morbilidade considerável que, se não tratada, pode levar à morte do hospedeiro. (2) Em 2008, foram estimados no mundo, cerca de 12,7 milhões novos casos de cancro e 7,6 milhões de mortes por cancro, sendo que 56% dos casos e 64% das mortes ocorreram nos países em desenvolvimento. (3)

O cancro pertence a uma família complexa de doenças, com processos que evoluem por *multi-steps*. Do ponto de vista clínico, é um largo grupo de doenças, que varia na idade de aparecimento, taxa de crescimento, estado de diferenciação celular, detetabilidade, grau de invasão, potencial de metastização, resposta ao tratamento, e prognóstico. Do ponto de vista molecular e biológico, o cancro consiste num número relativamente pequeno de doenças causadas por defeitos moleculares similares nas funções celulares, resultantes de tipos de alterações comuns. E, por último, o cancro é uma doença de expressão de genes anómalos, sendo que existem inúmeros mecanismos pelos quais ocorrem estas alterações de genes. Estes podem ocorrer por via direta, danos ocorridos no DNA, como por exemplo, mutações de genes, translocações, amplificações, deleções, perda de heterozigotia, ou por mecanismos resultantes de uma transcrição ou translação anómala. O resultado final é um desequilíbrio entre a replicação e a morte celular numa população de células tumorais que induzem o crescimento do tecido tumoral. Já nos tecidos normais, há um equilíbrio entre a replicação celular e a morte celular. Os tumores assemelham-se aos tecidos normais pelo menos nas fases iniciais do seu crescimento e desenvolvimento. Podem desenvolver-se em qualquer tipo de tecido ou órgão que contenha células capazes de se dividirem. Ainda que possam crescer rápida ou lentamente, a sua taxa de crescimento, geralmente, excede a dos tecidos normais adjacentes. (2)

Sendo, as doenças cancerígenas, uma das principais causas de morte em toda a Europa, estudos que têm como objetivo a descoberta de novos compostos com atividade anti-tumoral, têm-se intensificado, tornando-se um os objetivos mais importantes na química médica. Os agentes

quimioterapêuticos usados na terapia do cancro compreendem moléculas que interagem com o DNA, sendo um dos principais grupos de interesse neste tipo de investigação. Além destes, as investigações nesta área têm revelado a existência de um conjunto de moléculas que agem como agentes anti-tumorais, sendo os principais os compostos intercalantes e os compostos alquilantes, (4) (5) utilizados na Terapia Fotodinâmica (PDT do inglês *Photodynamic Therapy*) a qual combina o uso de substâncias fotossensibilizadoras com a luz visível. (6)

Recentemente, Coelho (7) estudou a interação entre o DNA e o intercalante Azul de Metileno (MB) que permitiu identificar algumas das ligações entre estas moléculas bem como o efeito da radiação UV no DNA quando o MB está presente, tendo sido verificado que os grupos de ribose no DNA são os mais afetados pela radiação UV, uma vez que é possível a abertura dos anéis da ribose e também os grupos fosfatos são particularmente lesados. Por sua vez, Rocha (8) concluiu que o intercalante tem um efeito protetor do DNA, prolongando o tempo necessário para este degradar totalmente o DNA. No que diz respeito às bases, a adenina e timina sofreram danos quando irradiadas com luz UV e na ausência do intercalante. Contudo na sua presença, os danos são mínimos. As outras base, a citosina e guanina, foram degradadas em ambas as situações, isto é, quer na presença quer na ausência d intercalante. No caso da citosina inferiu-se que ocorreu um processo de fotoisomerização, ou seja, ocorreu formação de 5 isómeros de citosina.

Através deste trabalho, pretende-se compreender os mecanismos de interação entre o DNA e o 2,2'-bypiridil, estudando a influência da radiação UV no complexo DNA-2,2'-bypiridil. Este é um composto utilizado para sintetizar compostos metálicos como o Ruténio (II), Ruténio (III) e Paládio (II). Foi estudado o efeito da radiação UV por meio da espectroscopia de ultravioleta-visível de soluções aquosas destes compostos e espectroscopia de infravermelho em filmes finos do 2,2'-bypiridil e de DNA produzidos pela técnica de derramamento após irradiação da solução aquosa destes compostos. Esta dissertação encontra-se dividida em mais 6 capítulos. Sendo que, no Capítulo 2, serão introduzidas algumas noções teóricas para a compreensão de conceitos que vão ser usados ao longo deste trabalho, tais como, mecanismos de interação da radiação UV com a matéria, terapia anti tumoral com uso de radiação e ação de intercalantes. No capítulo 3 é descrito todo o procedimento experimental, sendo indicado, os métodos de preparação de soluções e amostras e a montagem experimental usada para irradiar as amostras com luz UV. A caracterização através de radiação UV-Vis e através de Infravermelho encontra-se nos Capítulos 4 e 5, respetivamente.

Efeito da Radiação no DNA e de Interlantes

2.1. Molécula de DNA e Radiação UV

A molécula de DNA é responsável pela manutenção e transmissão da informação genética ao longo das gerações, sendo por isso fundamental que esse património genético seja protegido. Durante a reprodução, o DNA é replicado e é propagado o seu material genético. As sequências de DNA definem o organismo, desde os traços físicos e até, a susceptibilidade à doença. Como está hoje bem estabelecido, a sequência de DNA é transcrita para biomoléculas de RNA, que são depois utilizadas na tradução - síntese de proteínas para codificar a sequência proteica. A chave para o desenvolvimento de terapêuticas quimioterapêuticas passa por compreender ao nível molecular como a informação genética é expressa e como estimular ou prevenir a expressão génica. (9)

A molécula de DNA, é um dos principais alvos de diversos agentes genotóxicos capazes de provocar alterações relevantes na sua estrutura, podendo dar origem a mutações e a um funcionamento deficitário das tarefas celulares primordiais. (10)

Efeitos genotóxicos das diferentes regiões do espectro da radiação UV são mediados por diferentes mecanismos. O espectro de radiação UV (**Figura 1**), por ter a capacidade de produzir efeitos biológicos diferentes, foi subdividido em quatro regiões distintas: ultravioleta A - UVA (320-400 nm), ultravioleta B - UVB (280-320 nm), ultravioleta C - UVC (200-280 nm) (3) (6) e ultravioleta-V (vácuo) - 100-200nm, sendo esta última uma sub-região que ainda não está bem definida no meio científico mas é reconhecido que este tipo de radiação não se transmite através do ar, sendo absorvida pelo Oxigénio e Nitrogénio antes de atingir a atmosfera. (11)

A radiação UV é actínica, ou seja, é um tipo de radiação eletromagnética que consegue produzir reações fotoquímicas. Estas reações podem ser do tipo ionização, ativação ou dissociação das moléculas. (2) No caso específico do UV, as reações mais frequentes são as de ativação e dissociação, uma vez que apenas para comprimentos de onda inferiores a 100nm se verifica a ionização das moléculas irradiadas.

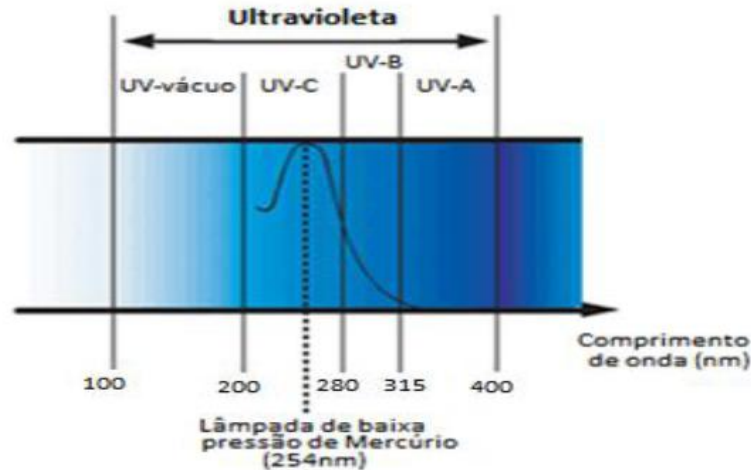


Figura 1 - Divisão da região Ultravioleta do espectro, salientando-se a banda de região de uma lâmpada de baixa pressão de Mercúrio. (12)

A camada do ozono, situada na estratosfera (15 a 30 km da superfície), funciona como filtro à radiação Ultravioleta. (3) Das quatro regiões definidas anteriormente, o UV-B e o UV-C são as regiões mais perigosas, sendo de destacar o UV-C por ser a radiação mais energética e a menos penetrante. (2) Esta deveria não representar perigo, pois teoricamente, é absorvida pela Camada de Ozono, contudo, devido ao aumento da poluição atmosférica e ao aumento da emissão de *CFC's* (*Clorofluorcarbono*) esta tem vindo a degradar-se levando a que a radiação UV-C consiga chegar à superfície terrestre sem a atenuação devida, podendo produzir danos significativos. (13) Atualmente, existem locais na superfície terrestre em que os níveis de UV-C correspondem a 1% da radiação UV solar. Com o aumento dos níveis de radiação UV-C à superfície terrestre, surge a necessidade de se estudarem os efeitos desta no ser humano. No caso da radiação UV menos energética, a UVA e UVB, esta tem a capacidade de penetrar nesta camada e conseguir induzir uma infinidade de reações fotoquímicas nos organismos à superfície da Terra. (14) Assim é possível inferir que quando amostras biológicas são irradiadas, com radiação UV, ocorre a formação de diversos tipos de lesões de DNA, as quais possuem diferentes propriedades mutagénicas. Os principais produtos dos danos causados no DNA pela radiação UVC são dímeros de pirimidina, e a radiação UVA e UVB, que não são absorvidos pelos ácidos nucleicos, podem induzir nas células uma cascata de fotoreações acompanhadas pela produção de espécies reativas de oxigénio (*EROs*). No entanto, as células possuem os seus mecanismos de reparação de DNA, reparo por excisão no caso de formação de dímeros de pirimidina, enquanto que os produtos resultantes de um ataque de DNA por radicais livres (nas ligações com proteínas e ligações cruzadas) são reparados de forma menos eficaz e com provável ocorrência de erros por parte dos sistemas de reparo. Portanto, é possível inferir que a radiação ultravioleta C tem um papel indutivo na produção de lesões no DNA e consequentemente carcinogénico. (15)

A radiação UV-C é tão perigosa para o DNA como para o RNA, devido ao facto de os componentes dos ácidos nucleicos, tanto as purinas como as pirimidinas possuírem o seu pico de absorção no comprimento de onda de aproximadamente 260 nm (3) e este valor de pico está dentro

do intervalo UV-C, como é possível observar na **Figura 2**. A maior consequência da exposição à radiação UV-C é a formação de ligações cruzadas entre componentes dos ácidos nucleicos da mesma cadeia, ou entre componentes de cadeias diferentes. (11) As dimerizações, ou ligações cruzadas, são mais prováveis em componentes da mesma cadeia devido à estrutura do DNA/RNA e devido ao emparelhamento das bases na mesma cadeia. (3)

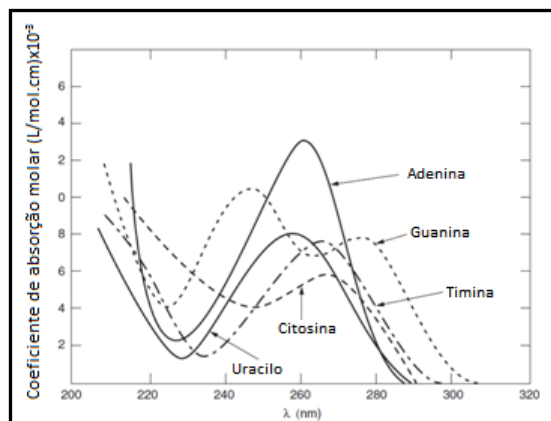


Figura 2 - Espectros de Absorção das diferentes bases azotadas dos ácidos nucleicos. (11)

As pirimidinas, de todos os componentes, são as que possuem locais mais vulneráveis à formação de fotolesões, (11) devido ao facto de possuírem uma estrutura menos complexa que a das purinas. As pirimidinas são bases heterocíclicas, estrutura da qual derivam moléculas como a timina e a citosina. (16) (**Figura 3**).

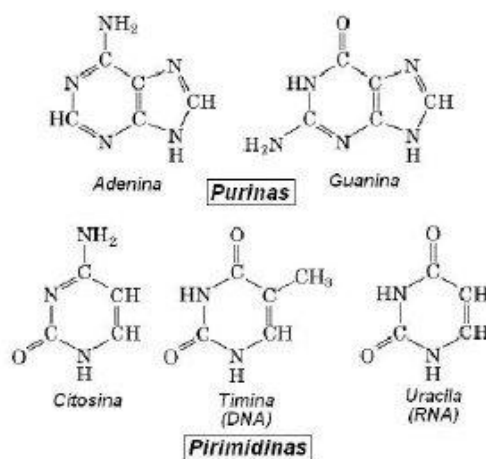


Figura 3 - Estrutura química das bases purinas (adenina e guanina) e pirimidinas (citosina, timina e uracilo) (12)

Os casos mais frequentes de fotolesões, verificam-se em timinas adjacentes embora também se verifiquem casos de ligações entre citosinas e guaninas. A timina é o componente que mais facilmente sofre dimerização, uma vez que, a energia necessária para quebrar a dupla ligação T=A é menor do que para quebrar a tripla ligação C≡G. (17) Estas alterações nos ácidos nucleicos podem afetar seriamente a reprodução celular. Os resultados mais frequentes são o aparecimento de mutações e em casos mais graves, morte celular. Os dímeros formados não se conseguem

emparelhar com outros nucleótidos e não são diretamente mutagênicos, mas se forem criados dímeros suficientes, o DNA não se consegue replicar. (18) A nível molecular, os dímeros de pirimidinas têm a capacidade de inibir o progresso das DNA polimerases. Quando a DNA polimerase atinge uma destas lesões durante a replicação, a enzima vai tentar instalar o nucleótido oposto à lesão, reconhecendo apenas a lesão como uma base desemparelhada. (19)

Como cada dímero de pirimidina pode atuar como bloqueador da transcrição e replicação (apenas uma pequena fração de dímeros resultam em mutação), os efeitos inibitórios da radiação UV no mecanismo de transcrição e replicação são mais significativos no crescimento celular do que os seus efeitos mutagênicos. (19)

2.2. Terapia Fotodinâmica e Fotossensibilizadores

Uma das muitas formas de usar radiação no combate a patologias tumorais é a terapia fotodinâmica, a qual combina o uso de luz visível com drogas fotossensibilizadoras (ou corantes) que possuem pouca ou nenhuma toxicidade às células na ausência de luz visível, (20) para causar morte celular. (21) Esta técnica baseia-se na administração de um corante não tóxico, de forma tópica ou sistêmica, sensível à luz seguida da irradiação em baixas doses com luz visível de comprimento de onda adequado. (12) Na presença de oxigénio encontrado nas células, a droga fotossensibilizadora poderá levar à ocorrência de reações que induzem a morte de células tumorais.

Um bom fotossensibilizador deve exibir alta seletividade por células tumorais, baixa toxicidade na ausência de luz e grande rendimento na geração de espécies reativas. (5)

Relativamente aos mecanismos fotossensibilizadores, estes são caracterizados pela absorção de radiação UV, de modo endógeno e exógeno, por moléculas fotossensibilizadoras que levam à excitação das moléculas para o seu estado tripleto.

As moléculas fotossensibilizadoras são agentes que, ao serem excitados por luz, produzem espécies reativas, nomeadamente *espécies reativas de oxigénio* – EROs, em que a energia é transferida para o oxigénio molecular, propiciando a ocorrência de danos no DNA. (22)

Este tipo de mecanismos pode ocorrer de dois modos diferentes: as reações do *Tipo I* (produção de espécies reativas que interagem com moléculas da sua vizinhança por transferência de eletrões ou hidrogénio, ocorrendo a formação de radicais livres) ou do *Tipo II* (formação de oxigénio no estado singleto por transferência de energia ao átomo), como é possível observar na **Figura 4**.

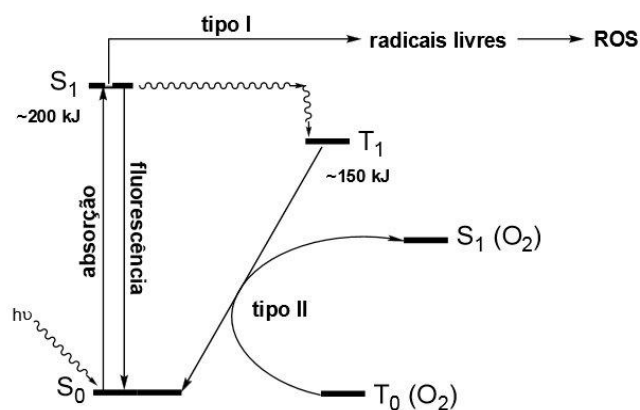


Figura 4 - Esquema explicativo dos Mecanismos Fotossensibilizadores
(Adaptada de (90))

A ativação do fotossensibilizador por absorção de luz provoca a passagem do seu estado fundamental (S_0), para um estado excitado (S_1). Neste estado, o fotossensibilizador perde rapidamente a sua energia decaindo e pode experimentar dois tipos de processos, um radiativo e um não radiativo. No processo radiativo, o fotossensibilizador regressa ao S_0 , por fluorescência. No processo não radiativo, os eletrões sofrem uma inversão de spin passando a um estado excitado tripleto (T_1) (23) (24), **Figura 4**. A produção deste estado pelo fotossensibilizador determina os seus efeitos fototerapêuticos e a probabilidade da formação do estado tripleto por fóton absorvido é como sendo o rendimento quântico tripleto do fotossensibilizador. Deste modo, uma elevada formação do estado tripleto é requerida para uma elevada eficácia do fotossensibilizador. Neste estado, o fotossensibilizador pode dissipar a sua energia e regressar ao S_0 através de um processo de emissão radiativa, designado de fosforescência, ou pode sofrer *queching* (processos de desexcitação não radiativos). Os mecanismos de *queching* do estado excitado tripleto ocorrem segundo dois tipos de reações fotodinâmicas, do *Tipo I* e do *Tipo II*, **Figura 4**. Na reação do *Tipo I*, o fotossensibilizador no estado T_1 reage diretamente com o/os substrato/s, tais como membranas das células ou moléculas, havendo transferência de um eletrão ou um próton entre ambos, dando origem a um radical anião ou um radical catião, respetivamente (25) (26). Na presença de oxigénio, e como estes radicais livres são espécies altamente instáveis, a maioria reage instantaneamente para produzir o radical anião superóxido ($O_2^{\cdot -}$). Este radical pode criar espécies altamente reativas, radicais hidroxilo (OH^{\cdot}), por reação com peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Estes, uma vez gerados, podem reagir com o substrato. Por sua vez, na reação do *Tipo II*, o fotossensibilizador no estado T_1 pode transferir a sua energia diretamente ao oxigénio molecular, cujo estado fundamental por si só é também um estado tripleto - $T_0(O_2)$, produzindo o estado excitado do oxigénio, oxigénio singleto - $S_1(O_2)$

O oxigénio singleto é uma espécie altamente reativa, com tempo de meia vida muito curto, que reage diretamente com moléculas biológicas próximas do seu local de formação, dentro de um raio de ação aproximadamente 20 nm e com tempo de duração de aproximadamente 40 ns (27). Todavia, recentemente tem-se sugerido que o tempo de duração do oxigénio singleto ronde os 6 microssegundos e que o raio de difusão seja aproximadamente 300 nm *in vivo* (27)

(28). Teoricamente, o oxigênio singleto só pode interagir com moléculas próximas e estruturas que se encontrem dentro do raio de ação. As espécies reativas de oxigênio, formadas pela reação fotodinâmica são conhecidas por despoletar várias reações com biomoléculas entre as quais: resíduos de aminoácidos em proteínas, lípidos insaturados como o colesterol e bases dos ácidos nucleicos, etc. Estas interações provocam danos, potencial destruição das membranas celulares e desativação de enzimas, induzindo morte celular. O oxigênio singleto é considerado a principal espécie citotóxica formada durante o processo fotodinâmico (25) (27) (29). Ambas as reações (*Tipo I* e *II*) ocorrem em simultâneo, e a razão entre elas depende do tipo de fotossensibilizador usado, da concentração de substrato e da quantidade de oxigênio disponível. Há evidências de que a reação do *Tipo II* predomina na indução das lesões celulares, uma consequência da interação entre o fotossensibilizador irradiado e o oxigênio molecular.

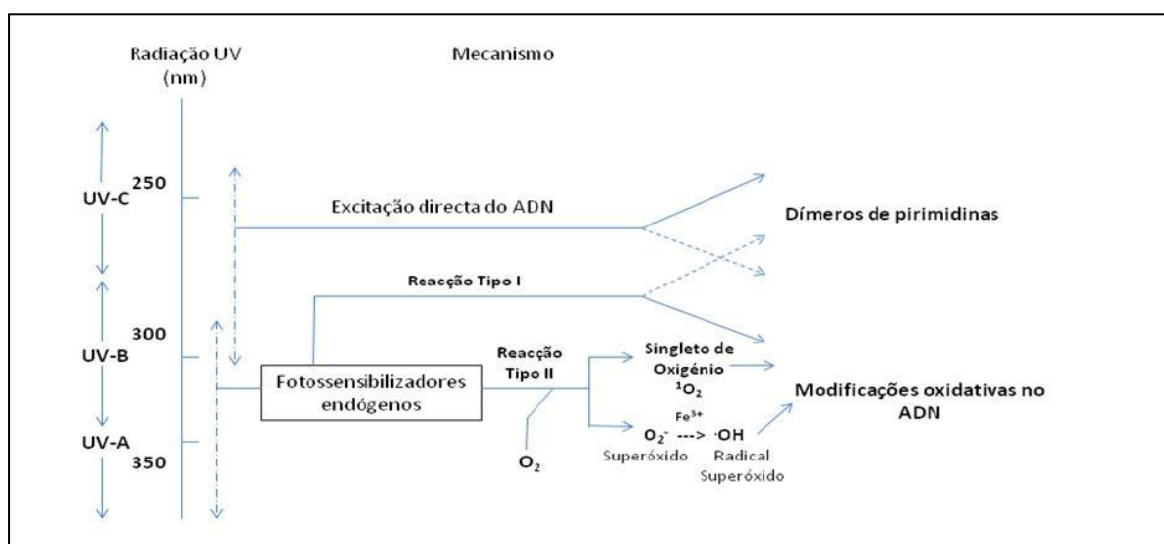


Figura 5 - Mecanismos de ação da radiação UV com Fotossensibilizadores

Como evidenciado na **Figura 5**, a absorção direta da luz incidente, pelos componentes celulares, da radiação UVB e UVC, ou os mecanismos fotossensibilizadores propiciados por parte da radiação UVA são as duas vias causadoras de danos celulares por parte da radiação ultravioleta no DNA. (13) A absorção de fótons de menores comprimentos de onda, referentes às bandas de UVC e UVB, pelas bases nitrogenadas do DNA, resulta principalmente em reações de formação de estados excitados. Consequentemente, diversas reações químicas são propiciadas e vários tipos de lesões são produzidos. As lesões ocorrem por meio da formação de fotoprodutos diméricos próximos a bases de pirimidina adjacentes como o dímero pirimidina ciclobutano ('*Cis-Syn-ciclobutano*' - CPDs), **Figura 6A** e 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PPs) ou até dímeros de Dewar (DewarPPs), **Figura 6B**, os quais possuem uma forte importância nos efeitos citotóxicos, mutagénicos e carcinogénicos desta gama. (7) (30)

Os dímero pirimidina ciclobutano (*CPDs*) são formados por ligações covalentes entre os carbonos 5 e 6 de duas pirimidinas adjacentes, formando-se assim um anel ciclobutano. Os *6,4-PPs* são caracterizados por uma ligação covalente entre os carbonos 6 e 4 de duas pirimidinas vizinhas. (31) (32) Mas estes fotoprodutos do tipo *6,4-PPs* possuem outra particularidade: são prontamente convertidos em *DewarPPs* quando expostos a radiação UV de cerca de 320 nm (**Figura 6B**), os quais são moderadamente foto-ativáveis e podem ser revertidos para *6,4-PPs* sob ação de radiação de ondas curtas. Falhas no reparo desse processo propicia mutações nas células epidérmicas, gerando o desenvolvimento de células cancerígenas. (7)

Os *CPDs* e os *6-4PPs* são formados diretamente pela absorção dos raios UV pelo DNA. A formação dos *isómeros de Dewar* (*DewarPPs*) é dependente da fotoisomerização da lesão 6-4PP pela absorção de fótons com comprimento de onda próximos a 320nm. E os maiores comprimentos de onda de radiação UV solar (UVA) são os mais eficientes para induzir a *lesão 7,8-dihidro-8-oxiguanina (8-oxoG)*, considerada um marcador de danos oxidativos na molécula de DNA. (33)

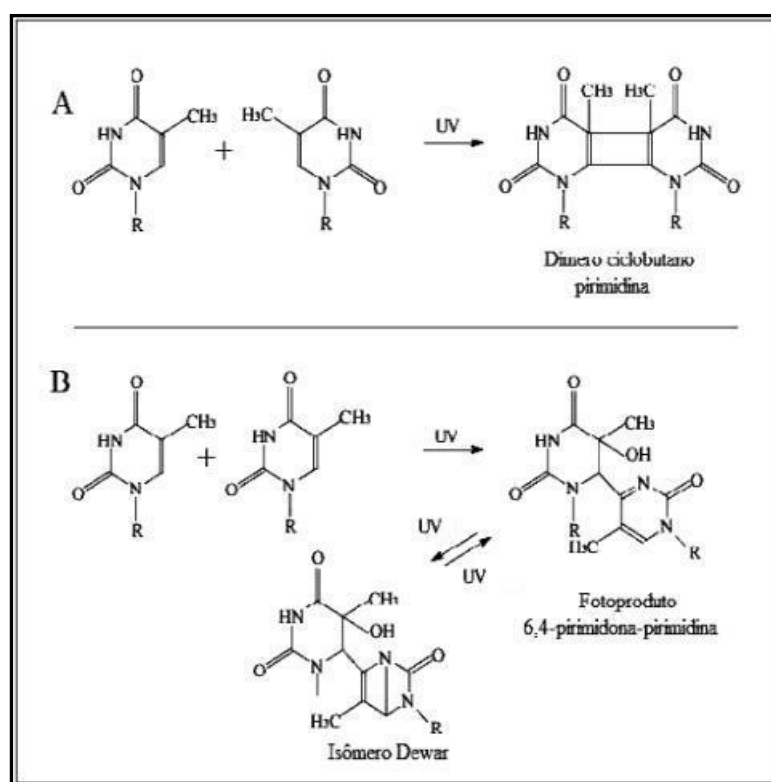


Figura 6 - Formação de dímero ciclobutano pirimidina (A); fotoprodutos 6,4—pirimidona-pirimidina e isômero de Dewar (B), a partir de bases pirimidínicas expostas à radiação UVC (adaptado de (88))

A oxidação de bases também é indiciada como um tipo de lesão mutagénica onde a produção indireta via *EROs* é sugerida como a base da mutagénese e carcinogénese em estudos com radiação UVA. (34) Este facto fica mais fortalecido devido à baixa absorção de fótons de UVA pela molécula de DNA. Por isso, torna-se evidente que a eficiência de produção de fotoprodutos por UVA é

significativamente menor quando comparada às bandas de UVB e UVC. (3) Assim, justamente pela conjugação destes fatores, infere-se que a indução de bases oxidadas, após a irradiação de DNA e de culturas de células com luz UVA, sejam o principal tipo de lesão formada por esta banda de comprimentos de onda. (35)

De entre todas as lesões que são formadas no DNA após exposição à radiação solar, os fotoprodutos de pirimidina possuem a maior relevância biológica, sendo os *CPDs* considerados os mais importantes devido à sua abundância relativa, pelo seu reparo mais lento e pela sua mutagenicidade conhecida. Diversos estudos têm demonstrado o envolvimento de *CPDs* em diferentes processos celulares, tais como mutagénese, apoptose e carcinogénese. (36) (8) Entretanto, o impacto biológico das lesões *6-4PPS* pode ter uma importância tão grande quanto *CPDs* em termos de indução de mutações após exposição. Relativamente ao foto-reparo dessa lesão de DNA, exercido pela enzima *6-4PP-fotoliase*, resulta numa redução dos níveis de apoptose em células humanas deficientes em reparo de DNA. (8) Complementando essa resposta, o foto-reparo de ambas as lesões pelo uso das enzimas *CDP-fotoliase* e *6-4PP-fotoliase* resulta em valores de apoptose similares aos verificados nas células controle não irradiadas. Em relação aos *DewarPPs*, estes fotoprodutos são reparados do genoma das células de mamíferos com uma cinética e eficiência similares à do reparo de *CPDs*, assim, esta similaridade sugere que os *DewarPPs* podem contribuir significativamente na mutagénese que ocorre aquando exposição à luz solar. (37)

2.3. Intercalantes

Os intercalantes podem ter ação fotossensibilizadora, nas células-alvo tumorais, isentando, por outro lado, as células normais da sua ação tóxica, uma vez que não se ligam covalentemente às bases azotadas, purinas e pirimidinas como os agentes quimioterapêuticos. (38)

Os compostos intercalantes apresentam a capacidade de se inserirem no sulco da cadeia de DNA permitindo através da abertura da cadeia uma maior exposição das bases ao meio envolvente nos quais se encontram agente nocivos ao seu funcionamento. Por sua vez, os compostos alquilantes formam ligações covalentes com as moléculas que compõem a cadeia, preferencialmente no N-7 da guanina e no N-3 da adenina, (37) impedindo e inibindo o ciclo celular, nomeadamente os processos de replicação. (16) (17)

Os intercalantes são moléculas, usualmente compostos aromáticos planares catiónicos, que se inserem perpendicularmente no ambiente de dupla hélice do DNA sem a formação de ligações covalentes. (17) (18) As únicas forças que mantêm a estabilidade do complexo DNA-intercalante são forças *Van der Waals* e ligações de hidrogénio. (39) A presença deste tipo de molécula em contacto com a dupla hélice confere-lhe a capacidade de destabilizar a estrutura do DNA e caso estejam presentes no momento a irradiação, contribuem para o acesso de eletrões de solvatação. E é por essa razão que os intercalantes poderão ser usados como medicamentos anti tumorais e antissépticos. (19)

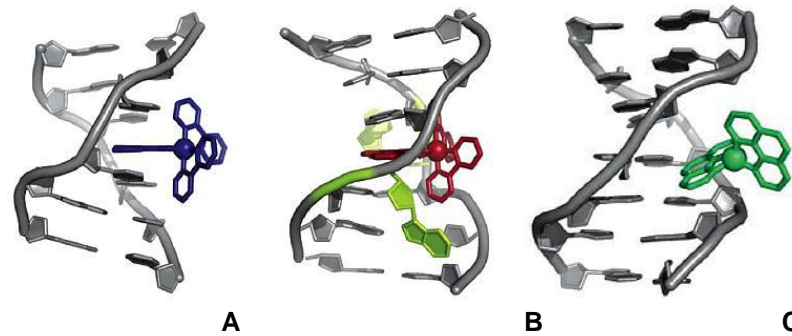


Figura 7 - Modelos de ligação ao DNA (A - Intercalação ; B-ligação electrostática ; C - *Groove Binding*) (adaptado de (40))

Intercalação, *groove binding* (ligação de superfície) e ligação eletrostática (ou externa/de superfície) são os principais modelos de ligação de um composto ao DNA. No caso da ligação de superfície, está diretamente envolvida a formação de pontes de hidrogénio ou interações de *Van der Waals* com as bases do DNA no sulco principal da hélice. A intercalação envolve a inserção de uma molécula entre pares de bases de DNA, o que resulta numa diminuição da torção helicoidal e alongamento do DNA. Por último, as interações electrostáticas entre as espécies catiónicas e o fosfato carregado negativamente presente no DNA ocorrem ao longo do exterior da hélice, normalmente. Assim, é evidente que a intercalação e a ligação de superfície estão relacionados com os sulcos da dupla hélice do DNA, enquanto que a ligação electrostática pode ter lugar fora do sulco ou na superfície da molécula de DNA. (12) (41)

Descrição Método Experimental

Neste Capítulo é feita a descrição dos métodos experimentais e metodologias usadas para sustentar este trabalho, materiais e métodos de preparação de amostras, fonte de irradiação e métodos de caracterização de amostras utilizados.

3.1. Materiais e Métodos de preparação de amostras

Neste sub-capítulo será feita a descrição dos materiais e compostos utilizados bem como a preparação das diversas amostras analisadas.

a) 2,2'-Bipyridyl

O 2,2'-Bipyridyl (CAS 366-18-7) é um composto químico de fórmula química $(C_5H_4N)_2$, sendo o utilizado neste estudo adquirido à empresa *Sigma Aldrich*. Este sólido incolor, comumente abreviado para *bipy*, é um composto planar e um isômero da bipyridina. É um quelante ligante bidentado, formando complexos com muitos metais de transição, sendo utilizado para sintetizar compostos metálicos de Rutênio(II), Rutênio(III) e Paládio(II). (42) A sua estrutura molecular encontra-se representada na **Figura 8**.

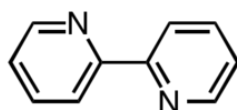


Figura 8 - Estrutura Química 2,2'-Bipyridyl

Foram preparadas soluções aquosas de 2,2'-Bipyridyl com uma concentração 1,5618g/L. Sabendo que a massa molar deste composto é de 156,18 g/mol, foi dissolvido 1,5618 g em 1L.

b) Ácido desoxirribonucleico - DNA

O ácido desoxirribonucleico (DNA – *deoxyribonucleic acid sodium from calf thymus lyoph*) (CAS 73049-39-5) com estrutura molecular representado nas **Figura 9**, foi adquirido à empresa *Sigma Aldrich*. Foi adquirido na forma de sal de sódio e hidrolisado, possuindo o íon de sódio

como contra-íão, a sua dissolução em água é facilitada permitindo a preparação de soluções aquosas de DNA de carácter aniónico.

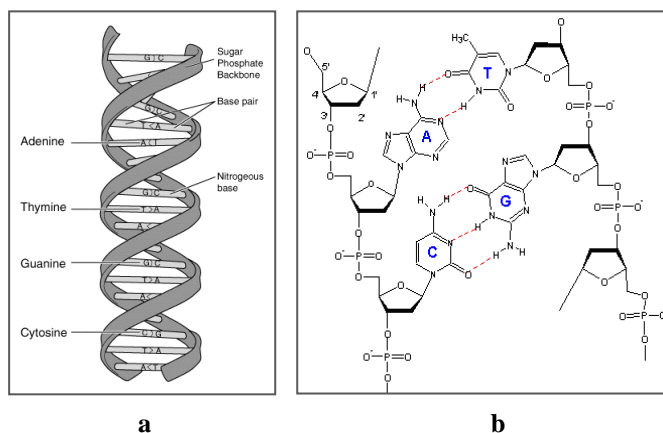


Figura 9 - Representação esquemática da molécula de DNA (a - Representação Geral e b - Pequeno Fragmento)

As concentrações das soluções aquosas de DNA preparadas foram de 5mg/100mL.

3.2. Fonte de Irradiação

O estudo do efeito da radiação sobre as soluções de 2,2'-Bipyridyl e DNA produzidas, foi realizado recorrendo a uma lâmpada de UV. A câmara de irradiação utilizada neste estudo foi projetada e montada no âmbito de um projeto de dissertação de tese de mestrado do Laboratório de Sistemas Moleculares e Funcionais do CEFITEC. Este aparelho possui um exaustor, bem como um sistema de segurança que não permite ter a lâmpada UV ligada com a porta do aparelho aberta, impossibilitando a exposição do operador à radiação UV. (12)

O sistema utilizado é constituído por uma fonte de luz Ultravioleta, uma lâmpada de vapor de mercúrio UVC germicida *Philips TUV PL-S 5W/2P 1CT*, de geometria cilíndrica, de baixa pressão de vapor de mercúrio com potência de 5,5W e tensão de entrada de 34V, sendo que a potencia UV-C é de 1,1W, com incidência predominante no comprimento de onda de 254 nm (que corresponde a uma zona de radiação UVC). (12) (8) (43) Neste comprimento de onda é obtido aproximadamente 85% do efeito germicida máximo. (44) Além disso, este possui um porta amostras ajustável que permite variar a distância da fonte de luz, possibilitando assim ajustar a irradiância a que a amostra está exposta. (12)

O forte efeito germicida induzido pela radiação UVC pode provocar conjuntivites temporárias (inflamações da mucosa do olho) e eritemas (vermelhidões na pele). Deste modo, é recomendável ter em atenção os limites de dose UV de exposição (como por exemplo, as recomendações da *American Congress of Governmental and Industrial Hygienist's* - ACGIH). (45) Sendo que, para um correto e seguro manuseamento deste tipo de lâmpadas é necessário respeitar um conjunto de normas e

regras impostas tais como a utilização de luvas e de óculos de proteção, e no caso de uma exposição prolongada devem ser tomados cuidados adicionais como o uso de viseira e capacete. (22)

Aquando exposição da matéria à radiação UV, são sujeitos a uma dose de radiação, D ($W.s/m^2$), que corresponde ao fluxo de radiação (irradiância – I) por tempo de exposição, $t(s)$, (34) ou seja:

$$D = I * t \quad (1)$$

Sabendo que Irradiância se pode definir como a medida que traduz a energia média por unidade de área e por unidade de tempo, expressa em W/m^2 ; geometricamente, a Irradiância numa pequena superfície 'P', a uma distância 'a' da fonte de radiação, linear e ideal de comprimento ' ℓ ': (18)

$$I = \frac{\varphi}{2\pi^2 \cdot \ell \cdot a} * (2\alpha + \sin 2\alpha) \quad (2)$$

Sendo φ a potência UVC da lâmpada (W) e o valor α em radianos (rad) dada por: (46) (19)

$$\alpha = \arctan\left(\frac{\ell}{2a}\right) \quad (3)$$

Para as irradiações efetuadas neste trabalho, a distância da fonte ao fotodetector e consequentemente à amostra foi de aproximadamente 4 cm. Sabendo que a lâmpada tem 0,134 m de comprimento, a irradiância é aproximadamente $30,623 \pm 0,0013 W/m^2$.

3.3.Caracterização de Amostras

Nesta secção, é apresentada a descrição dos sistemas experimentais bem como as metodologias seguidas durante o estudo. É referido o processo de preparação das soluções destes compostos e a produção dos filmes de DNA e de 2,2'-Bipyridyl pela técnica de derramamento, pois permite a deposição num suporte sólido que imita o sistema biológico de matéria condensada. As soluções foram caracterizadas por espectrofotometria de UV e Visível (UV-Visível) e os filmes por espectrofotometria de Infravermelha por Transformada de Fourier (FTIR).

Os métodos espectroscópicos fornecem informação acerca da interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo que, um dos principais objetivos é o estudo das transições entre os níveis de energia de átomos ou moléculas, às quais ocorrem por absorção de luz da região do ultravioleta ou visível, e por outro lado, os modos vibracionais e rotacionais que ocorrem por ação da radiação da zona do infravermelho.

3.3.1.Espectrofotometria de UV-Visível

Esta técnica espectrofotometria permite analisar as transições eletrónicas que podem ocorrer em sistemas poliatômicos, pois a radiação UV e a luz visível têm energia suficiente para transferir os eletrões das orbitais ligantes para orbitais anti-ligantes criando assim um estado de eletrónico excitado. A dissipação dessa energia absorvida pode ocorrer através de uma reação química, de emissão de luz ou apenas por emissão de calor. Assim, esta técnica permite analisar as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$. (47) Graficamente, esta técnica de caracterização possibilita a obtenção das bandas de absorvância (ou de transmitância) em função do comprimento de onda. Os picos observados

encontram-se centrados no comprimento de onda correspondente à energia que proporciona a ocorrência da transição eletrônica. A sua intensidade depende tanto da energia das orbitais moleculares, bem como da eficiência quântica das transições. É também possível identificarem-se desvios no comprimento de onda dos picos observados para comprimentos de onda maiores ou menores (efeito batocrômico e hipocrômico, respetivamente). (48) Nas moléculas, os eletrões que formam ligações químicas simples são designados por eletrões σ , enquanto os responsáveis pelas ligações duplas são chamados eletrões π . Em sistemas que contenham ligações duplas, os eletrões π predominam e determinam os estados de energia dos eletrões de valência, os quais são excitados por absorção de radiação visível ou UV. Existem ainda os eletrões não-ligantes que são designados por eletrões n . (30)

A caracterização espectroscopia é feita tendo por base os tipos de transições eletrônicas responsáveis pelo espectro. Assim, existem três grandes grupos de transições eletrônicas, em que o primeiro engloba as transições de uma orbital no estado fundamental para outra de maior energia, isto é, transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$. O segundo grupo corresponde a transições de uma orbital atômica não ligante para uma orbital molecular de maior energia, isto é, transições $n \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \sigma^*$. Por fim, o terceiro grupo inclui as transições de uma orbital no estado fundamental para outra de maior energia na direção da ionização da molécula e que se designam por orbitais de *Rydberg*. Todas estas transições estão associadas à absorção de energia de determinadas regiões do espectro eletromagnético: (8)

Tabela 1 - Transições eletrônicas associadas a regiões do espectro eletrónico.

TRANSIÇÕES	REGIÃO DO ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO
$\sigma \rightarrow \sigma^*$	Ultravioleta do Vácuo
$\pi \rightarrow \pi^*$	Ultravioleta
$n \rightarrow \pi^*$	Ultravioleta Próximo
$n \rightarrow \sigma^*$	Ultravioleta Longínquo

Para o estudo dos fenómenos absorção e de interação física/química entre o DNA e o 2,2'-*Bipyridyl* das soluções foi usado o espectrofotómetro *Shimadzu UV-2101PC*, existente no REQUIMTE/FCT-UNL - Departamento de Química/Laboratório de Biofísica Molecular. O espectrofotómetro usado é de feixe duplo, entre 300-900nm, constituído por uma fonte de radiação, um monocromador, um sistema ótico composto por espelho, um fotodetector e um conversor analógico-digital.

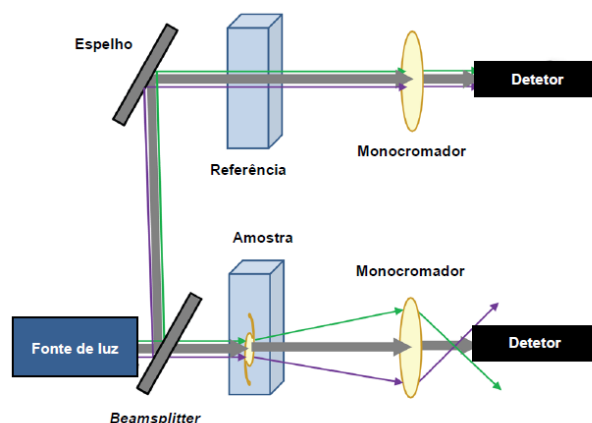


Figura 10 - Esquema do sistema óptico do espectrofotômetro UV-Vis. (Adaptada de (49))

As soluções de 2,2'-Bipyridyl e DNA foram analisadas por espectrofotometria UV-Visível em cubetas de quartzo com tampa (totalmente transmissíveis ao comprimento de onda utilizados), tendo sido adquiridos os espectros correspondentes num intervalo de comprimentos de onda entre 200 nm e 600 nm com uma resolução de 1,0 nm. Para referência foi utilizada uma cubetas de quartzo limpa com água pura *mili-Q*, uma vez que é o solvente de todas as soluções preparadas.

3.3.2. Espectrofotometria de Infravermelho por transformada de Fourier

Usando a técnica de derramamento, foram utilizados os substratos de fluoreto de cálcio (CaF_2) para a produção de filmes, porque este tipo de material é transparente para a região de infravermelho de 400 cm^{-1} a 4.000 cm^{-1} , utilizou-se o equipamento *Perkin Elmer Spectrum 2000* presente no Departamento de Química FCT-UNL, Lisboa. Na **Figura 11** encontra-se uma representação do sistema óptico do espectrofotômetro UV-Vis.

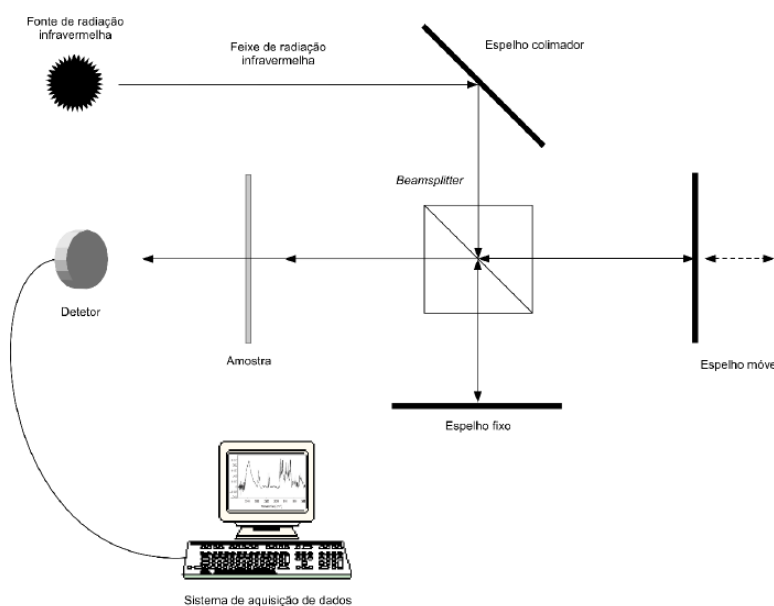


Figura 11 - Esquema ilustrativo de um espectrofotômetro FTIR. (48)

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica instrumental simples e rápida que permite evidenciar a presença de vários grupos funcionais. A radiação infravermelha provoca o aumento da amplitude de vibração das ligações covalentes entre átomos e grupos de átomos de compostos orgânicos. Como os grupos funcionais das moléculas orgânicas incluem átomos ligados por arranjos específicos, a absorção da energia infravermelha por um molécula orgânica ocorrerá de acordo com os tipos de ligações e de átomos presentes nos grupos funcionais específicos daquela molécula. Essas vibrações são quantizadas e, enquanto ocorrem, os compostos absorvem a energia de IV em regiões determinadas, (46) ou seja, a posição das linhas de absorção depende dos grupos funcionais presentes tendo estes comprimentos de onda específicos e assinaturas características, sendo por isso o espectro obtido único para cada substância (44) A energia de radiação cujo comprimento de onda corresponde ao infravermelho é apenas suficiente para provocar transições entre os níveis de energia vibracionais, permanecendo a molécula no seu estado fundamental. Estas transições entre os níveis vibracionais acontecem porque ocorre alterações do momento dipolar devido à variação da distribuição eletrônica em torno das ligações (13), existindo, portanto, dois tipos de vibrações moleculares: (7)

Estiramento (Stretching) : movimento ao longo do eixo da ligação de forma a que a distância interatômica aumenta ou diminui, podendo ser simétrico ou assimétrico;

Deformação (Bending): mudança do ângulo de ligação entre ligações com o átomo comum ou movimento de um grupo de átomos em relação a uma parte da molécula, levando a quatro modos de vibração bem definidos: Tesoura, Torção (Twist) , Rotação e Balanço (Wag). (44)

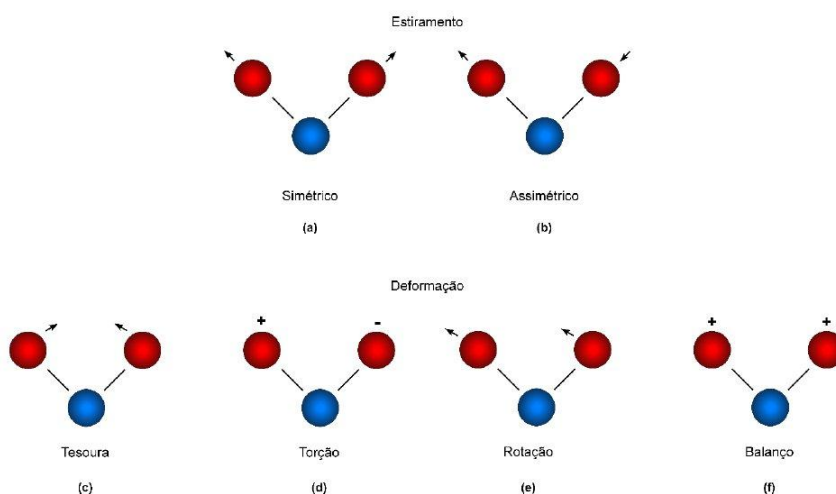


Figura 12 - Representação esquemática dos diferentes modos de vibração por estiramento (a) simétrico e (b) assimétrico; e por deformação (c) tesoura, (d) torção, (e) rotação e (f) balanço. (48)

3.4. Preparação das Amostras

As soluções utilizadas neste estudo foram preparadas dissolvendo o soluto em água ultra pura por um sistema *Milipore*, que produz água padrão do tipo *mili Q* que apresenta uma resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ a uma temperatura de 25°C . Estas soluções por forma a serem irradiadas em *cuvettes* de quartzo com tampa, foram adicionalmente colocadas em 3 banhos de ultrassons de 5 minutos, de forma a garantir que se obtinham soluções homogêneas.

Com o objetivo de se estudar o efeito da radiação UV nas amostras de *2,2'-Bipyridyl* e DNA, mais propriamente, a excitação vibracional - Espectroscopia por Infravermelho, as amostras foram preparadas para análise utilizando a técnica por *Derramamento*. Foram utilizados substratos de Fluoreto de Cálcio (CaF_2), uma vez que este material é transparente ao infravermelho na região de 4000 cm^{-1} a 600 cm^{-1} .

Para a correta lavagem dos substratos utilizou-se o seguinte procedimento :

1. Lavagem em detergente de uso comum;
2. Lavagem com solução *Helmanex* (solução de limpeza quartzo)
3. Imersão em banho de ultrassons a 50°C (cerca de 20 minutos)
4. Lavagem com solução piranha ($\text{H}_2\text{SO}_4\text{:H}_2\text{O}_2$ na proporção de 16:4) com o objetivo de eliminar todos os resíduos orgânicos contidos nos substratos hidrolisando também a superfície do substrato (é importante referir que esta solução é corrosiva e resulta de uma reação exotérmica – deve-se deixar arrefecer antes de imergir os substratos de forma a evitar a sua fragmentação, e é recomendado a sua preparação dentro da *hotte*, utilizando o material de segurança adequado);
5. Imersão em banho de ultrassons a 50°C (cerca de 20 min) - por forma a eliminar os resíduos orgânicos
6. Lavagem com água pura *mili-Q* de forma abundante;
7. Secagem com fluxo de azoto líquido e deposição dentro de um exsiccador, cerca de 12 horas, que contém sílica em gel (sólido inerte) no seu interior para controlar a humidade, pois devido à sua elevada adsorção é usada para secar o substrato.

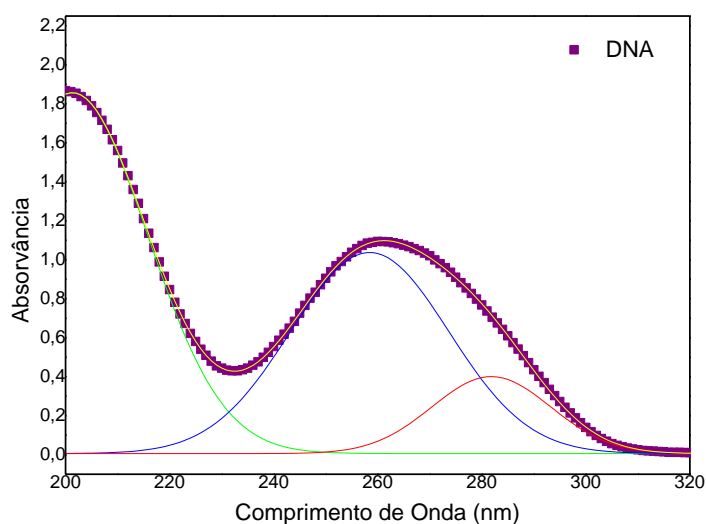
Relativamente à *técnica por Derramamento* utilizada, esta é caracterizada pela deposição, após secagem do substrato, de cerca de $200\mu\text{L}$ sobre o substrato com a ajuda de uma pipeta, deixando a solução em estudo espalhar-se, acondicionando-os depois numa caixa de *Petri* (de modo a evitar contaminações) dentro do exsiccador com sílica gel, durante um período de 12-16 horas e desta forma garante-se que a amostra está seca na altura da obtenção dos espectros, para posterior análise.

Análise da Cinética de Danos

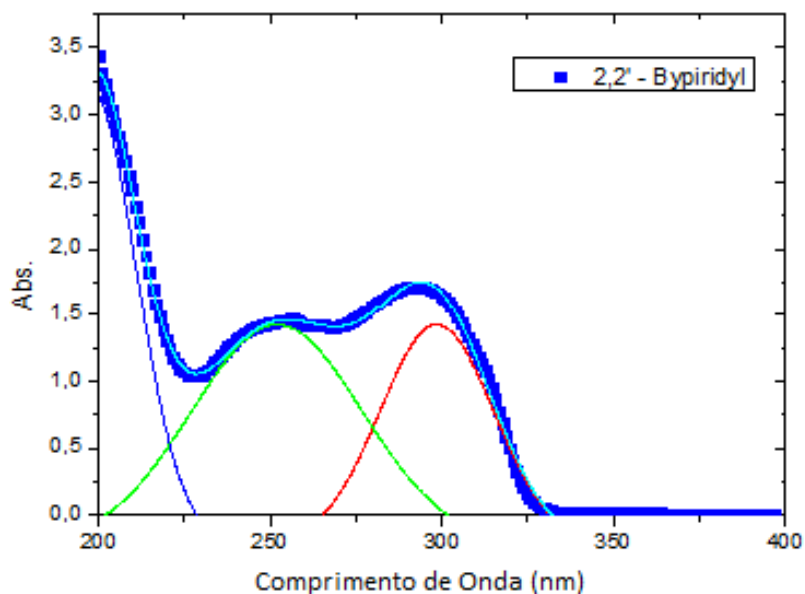
Neste capítulo apresenta-se a caracterização da cinética de danos causados ao DNA radiação ultravioleta, em presença de *2,2'-Bipyridyl*. Esta caracterização foi obtida por espectroscopia de absorção de UV em soluções aquosas de DNA e/ou de *2,2'-Bipyridyl*.

4.1 Caracterização de soluções de DNA e *2,2'-Bipyridyl*

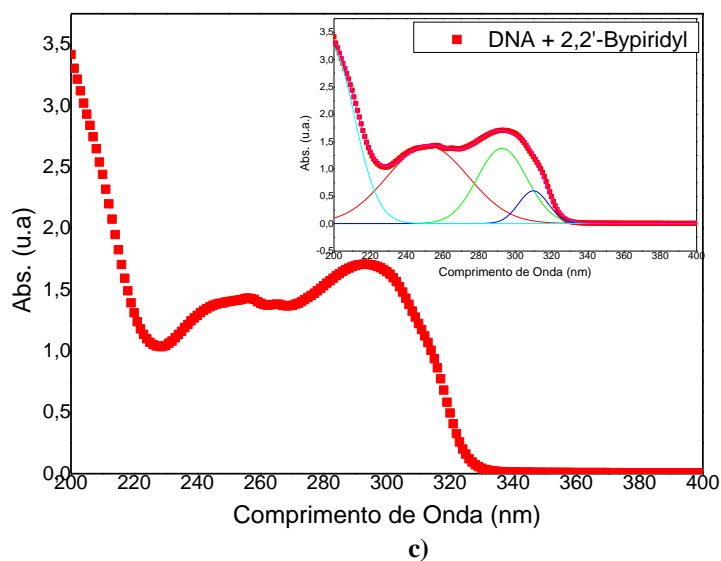
Nas **Figuras 13 a), b) e c)** encontram-se representados os espectros de absorção na região do UV/Vis das soluções de DNA, *2,2'-Bipyridyl* e $[1:1](v/v)$ DNA + *2,2'-Bipyridyl*, respetivamente. Os espectros obtidos foram adaptados por curvas Gaussianas com o intuito de melhorar a caracterização dos picos obtidos. Estas curvas encontram-se também representadas nas figuras.



a)



b)



c)

Figura 13 - Espectros de absorção na região do UV/Vis das soluções de a) DNA, b) 2,2'-Bipyridyl e c) [1:1](v/v) DNA + 2,2'- Bipyridyl

O espectro da solução de DNA, **Figura 13 a)**, revela as duas bandas características, uma a cerca de 260nm e outra a cerca de 200nm. A banda de 260nm é a banda da absorção de DNA conhecida e geralmente atribuída à bases de DNA. Por sua vez, a banda centrada a cerca de 200 nm, apesar de cortada pelo limite do espectro, pode ser atribuída à banda de adenina e também pode estar relacionada com as transições eletrônicas da guanina de $n \rightarrow \pi^*$ (207nm e 179nm), e da timina

de $\pi \rightarrow \pi^*$ (208nm e 173,5nm). A banda a cerca de 280nm está associada a transições de $\pi-\pi^*$ do DNA. (8) (50) As bandas e suas respectivas transições encontram-se listadas na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Bandas características de um espectro de UV-Vis de DNA (51)

	Banda 1	Banda 2	Banda 3
$\lambda(\text{nm})$	201,8 \pm 0,2	263,2 \pm 0,1	281,8 \pm 0,10
Absorvância	1,86 \pm 0,1	1,12 \pm 0,2	0,40 \pm 0,10
FWHM	31,8 \pm 0,2	45,4 \pm 0,2	26,88 \pm 0,10
Transições Eletrônicas	Guanina: $n \rightarrow \pi^*$ Timina: $\pi \rightarrow \pi^*$	Todas as Bases	$\pi-\pi^*$

O espectro da solução de 2,2-Bipyridyl, **Figura 13b**), apresenta três picos que adaptados por curvas gaussianas se encontram centrados a cerca de 200nm, 236nm e 292 nm. Os valores da posição destes picos estão de acordo com a literatura que define dois máximo de absorção a 235 \pm 2nm e 292 \pm 2nm, associados às transições $\pi-\pi^*$ da molécula. (52) As bandas e suas respectivas transições encontram-se listadas na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Bandas características de um espectro de UV-Vis de 2,2'-Bipyridyl (52)

	Banda 1	Banda 2	Banda 3
$\lambda(\text{nm})$	200 \pm 2	236 \pm 2	292 \pm 2
Absorvância	2,32 \pm 0,1	0,87 \pm 0,2	1,25 \pm 0,10
FWHM (nm)	48,9 \pm 1	33,8 \pm 1	41,77 \pm 0,10
Transições Eletrônicas	-	$\pi \rightarrow \pi^*$	$\pi \rightarrow \pi^*$

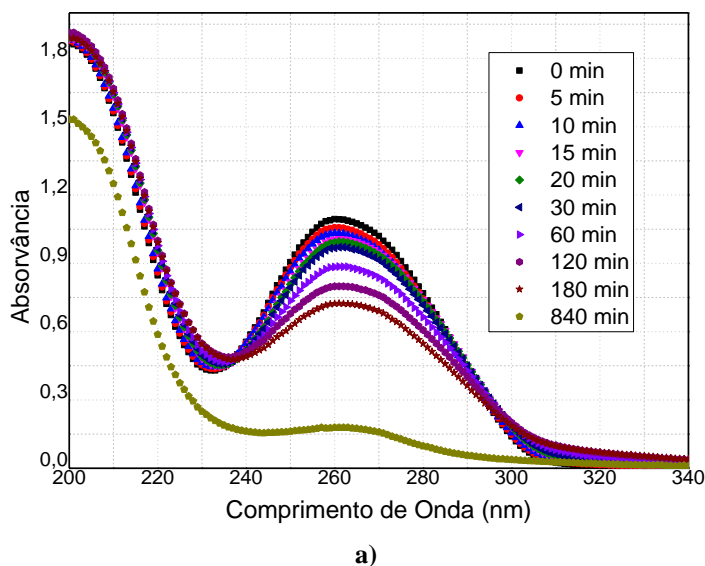
Por sua vez, o espectro de absorção da solução [1:1](v/v) DNA + 2,2-Bipyridyl apresenta três máximos, **Figura 12c**), determinados por adaptação de funções Gaussianas ao espectro. Estes picos encontram-se centrados a 251,71 \pm 0,2nm (característico da transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do 2,2'-Bipyridyl e da transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do DNA); 292,68 \pm 0,1nm (característico da transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do 2,2'-Bipyridyl e transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do DNA); e, 309 \pm 1nm (característico da transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do 2,2'-Bipyridyl). As bandas e suas respectivas transições encontram-se listadas na **Tabela 4**.

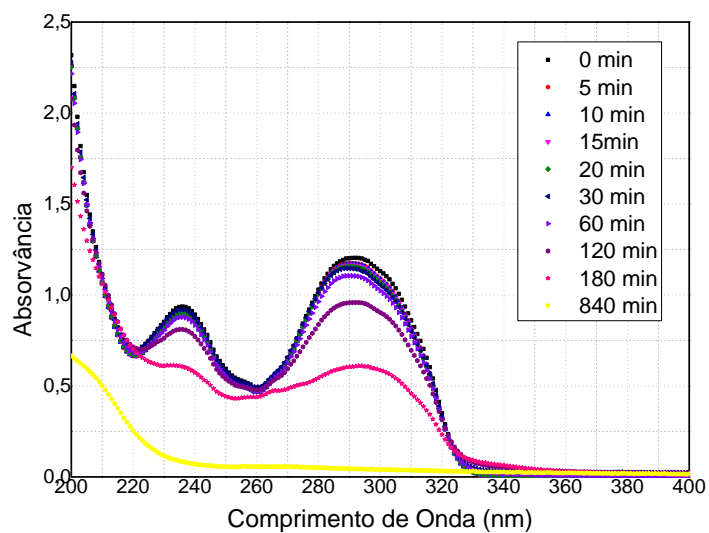
Tabela 4 - Bandas características de um espectro de UV-Vis da solução [1:1](v/v) DNA + 2,2-Bipyridyl

	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4
$\lambda(\text{nm})$	198,33 \pm 2	251,71 \pm 0,20	279,68 \pm 0,10	309 \pm 1
FWHM	31,1 \pm 0,2	52,62 \pm 0,10	32,14 \pm 0,20	19,36 \pm 0,10
Transições Eletrônicas	-	$\pi \rightarrow \pi^*$ (2,2'-Bipyridyl e DNA)	$\pi \rightarrow \pi^*$ (2,2'-Bipyridyl e DNA)	$\pi \rightarrow \pi^*$ (2,2'-Bipyridyl)

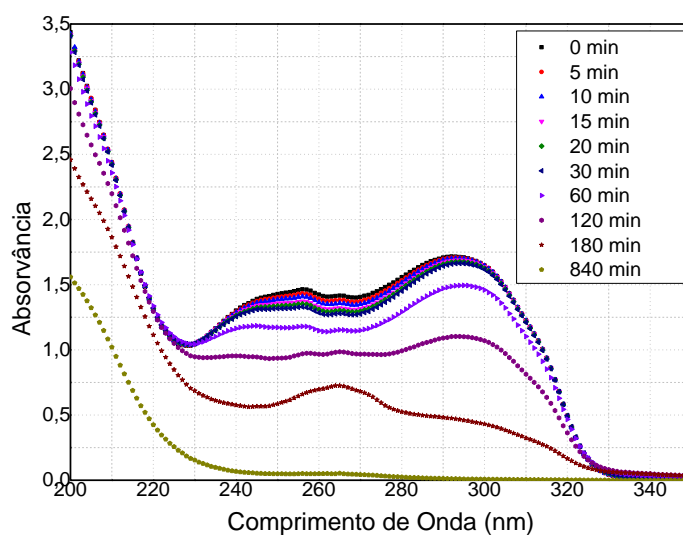
4.2. Caracterização do efeito de radiação UV

Seguidamente foi realizada uma análise dos espectros de absorção ao longo do tempo das três soluções aquosas, quando o tempo de exposição à radiação UVC aumenta a evolução. Nas **Figuras 14 a), b) e c)** encontram-se representados os espectros de absorção na região do UV/Vis das soluções de DNA, de 2,2-Bipyridyl e de [1:1](v/v) DNA + 2,2-Bipyridyl, respetivamente.





b)



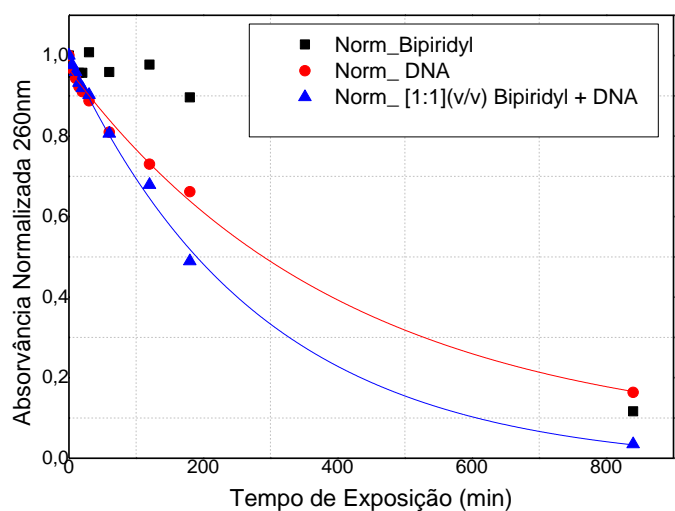
c)

Figura 14 - Evolução dos espectros de absorção de a) DNA, b) 2,2-Bipyridyl e c) [1:1](v/v) DNA + 2,2'-Bipyridyl com o aumento do tempo de exposição à radiação UVC.

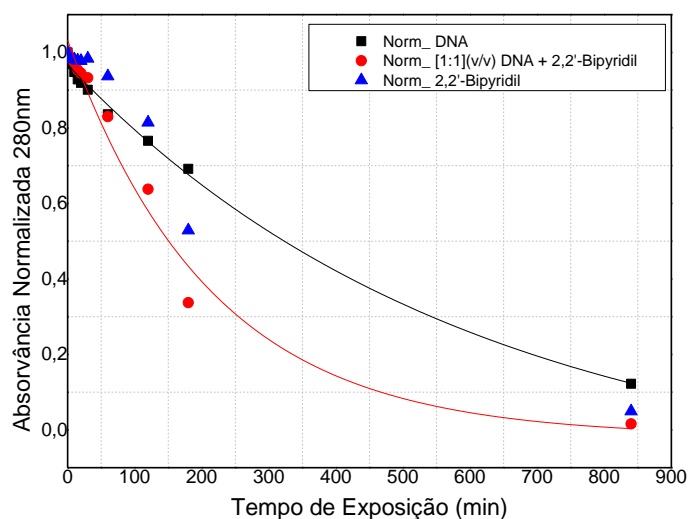
Através da análise dos gráficos e tabelas anteriores é possível observar o efeito hipocrômico, nas três soluções quando expostas à radiação UVC ao longo do tempo e simultaneamente uma diminuição da intensidade de absorvância. Esta diminuição indica que as moléculas em solução se degradam com a exposição à radiação e, portanto, que o UV danifica ambos os tipos de moléculas.

4.3 Análise de danos causados pela radiação UV

Analisando os picos característicos do espectro de absorção com o aumento do tempo de exposição, mais propriamente, os rários relativos ao pico de 280nm, pico característico de 2,2'-Bipyridyl e o pico de 260nm característico do DNA, associado às bases nitrogenadas, sabendo que para o melhor análise foram definidos os espectros das **Figuras 15 a) e b)** onde se encontram os espectros relativos ao pico 260nm e 280nm respectivamente, tendo em consideração a intensidade normalizada dos rários dos picos em função do tempo de irradiação.



a)



b)

Figura 15 - Evolução dos picos de absorvância normalizada de a) 260nm e b) 280 nm com o aumento do tempo de exposição à radiação UV das três soluções 2,2'-Bipyridyl, DNA e [1:1](v/v)2,2'-Bipyridyl + DNA

Na **Figura 15**, é possível analisar os tempos de decaimento das soluções de DNA e de [1:1](v/v) DNA+ 2,2'-Bipyridyl do pico característico de 260 nm e de 280 nm obtidos a partir da adaptação de uma exponencial traçada aos resultados experimentais. Na **Tabela 5** encontram-se os dados característicos dos *fittings* obtidos nos gráficos anteriores por forma a se proceder a uma análise mais detalhada da evolução.

Tabela 5 - Tempo de decaimento obtidos a partir das exponenciais de adaptação de exponenciais traçadas aos resultados experimentais do espectro de 260nm e de 280 nm

	T _{260 nm} (min)	T _{280 nm} (min)
DNA	410±70	595±10
2,2'- Bipyridyl+DNA	250±20	213±10

Através da análise dos resultados listados na **Tabela 5**, dos tempos de decaimento obtidos a partir das exponenciais de adaptação traçadas aos resultados experimentais do espectro de 260nm e 280nm é possível concluir que no caso dos pico de 260 nm, o tempo de decaimento da solução de DNA é de cerca de 410±70 minutos e, na presença 2,2'-Bipyridyl o tempo de decaimento passa a 250±20 minutos. No caso do pico de 280 nm, o tempo de decaimento da solução de DNA é de 595±10 minutos e, na presença de 2,2'-Bipyridyl o tempo de decaimento passa a 213±10 minutos. Tendo em consideração que a banda de 260nm está associadas às bases nitrogenadas, e o pico a 280 nm está associado à guanina, os valores dos tempos característicos mostram que a guanina leva mais tempo a se degradar que as outras bases, e, dado que ocorre um decaimento mais acentuado na presença de 2,2'-Bopyridil, estes resultados mostram que este intercalante ajuda a danificar as bases do DNA. Os valores dos tempos característicos revelam ainda que o 2,2'-Bipyridyl tem ainda um maior efeito sobre a guanina já que o valor é menor para a degradação da guanina.

Relativamente aos picos característicos do 2,2'-Bipyridyl (**Figura 14 b e 14 c**) as bandas passam por uma diminuição mais acentuada em 235 nm e 280 nm, o que se pode inferir que é o composto de intercalação que está a sofrer uma maior ação de luz UV. Além disso, por análise dos gráficos, é possível observar o efeito Batocrómico que confirma o modo de intercalação entre o DNA e o 2,2'-Bipyridyl. (53)

4.4. Conclusões

As soluções aquosas de DNA, 2,2'- Bipyridyl e [1:1](v/v) DNA + 2,2'-Bipyridyl foram caracterizadas por espectrofotometria, tendo sido atribuídas as respetivas transições eletrónicas às bandas encontradas.

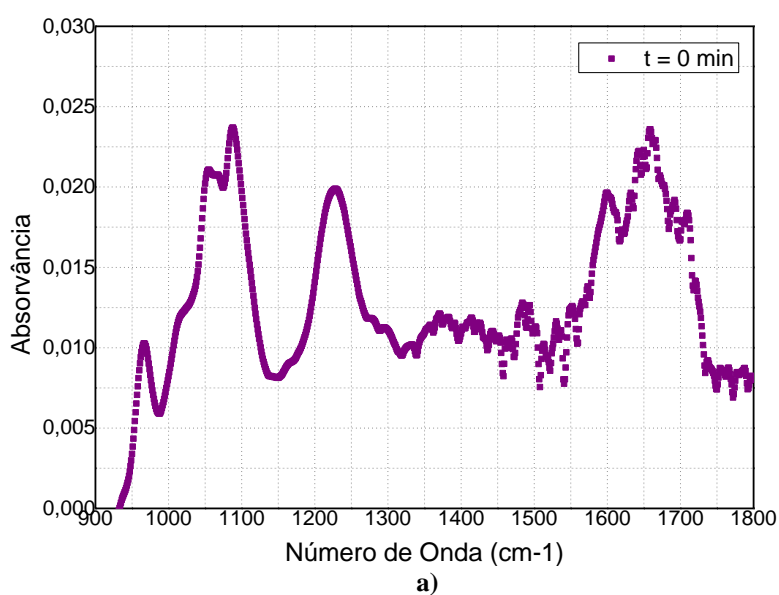
A evolução da absorvância a 260 e 280 nm revelou que a presença do 2,2'- Bipyridyl acentua a degradação do DNA e que acentua ainda mais o decaimento da guanina. Estes resultados permitem assim concluir que este intercalante pode ajudar a degradar a molécula de DNA.

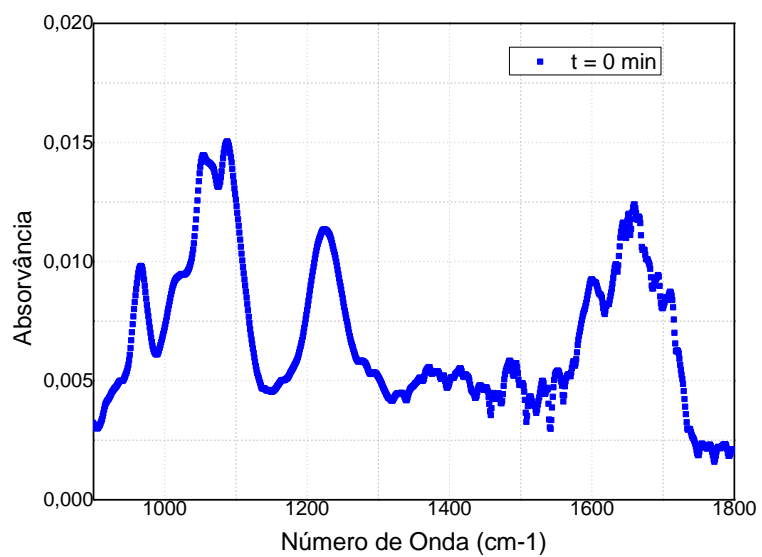
Caracterização de Danos por Infravermelho

Neste capítulo apresenta-se a caracterização da cinética de danos causados ao DNA por espectroscopia de infravermelho, do efeito de radiação ultravioleta, em presença de *2,2'-Bipyridyl*. Os estudos foram realizados em filmes finos de DNA e $[1:1](v/v)$ DNA + *2,2'-Bipyridyl* produzidos pela técnica de derramamento e usando as soluções aquosas previamente irradiadas para análise.

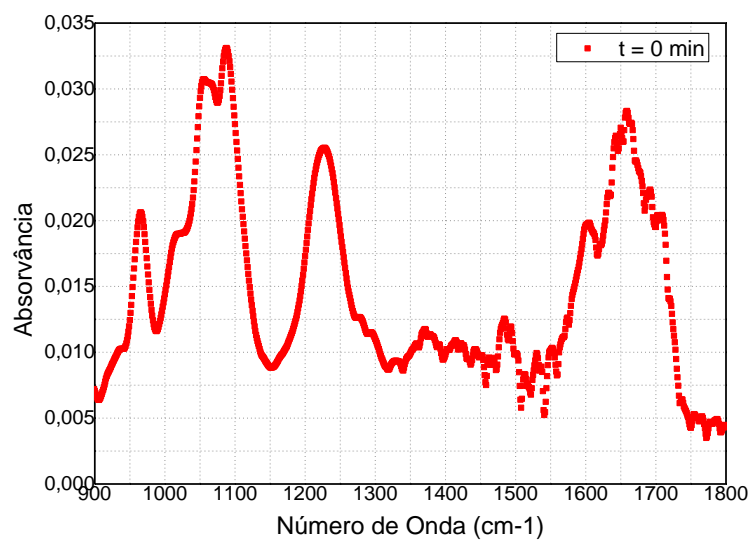
5.1 Caracterização do efeito de irradiação de DNA e intercalante

Na **Figura 16 a), b) e c)** encontram-se representados os espectros de absorção de infravermelho, no intervalo de 900 a 1400 cm^{-1} , de filmes de obtidos por derramamento de soluções aquosas de DNA, de *2,2'-Bipyridyl* e de $[1:1](v/v)$ DNA+*2,2'-Bipyridyl*.





b)



c)

Figura 16 - Espectros de absorção de infravermelho no intervalo de 900 a 1800 cm^{-1} de filmes preparados com soluções aquosas com irradiação de: a) DNA, b) 2,2'-Bipyridil e c) $[1:1]$ (v/v) DNA+2,2'-Bipyridyl.

A partir da **Figura 16 a)** podem ser identificados os principais componentes do DNA, nomeadamente: *açúcares, fosfatos e bases*. Para uma melhor análise destes espectros foram listadas na **Tabela 6** as diversas assinaturas espectrais compiladas do DNA e na **Tabela 7** as assinaturas espectrais compiladas de *2,2'-Bipyridyl*.

Tabela 6 - Principais bandas observadas no espectro de absorção na região do infravermelho de DNA e respetivas assinaturas espectrais (51) (54) (55) (56)

Número de onda (cm ⁻¹)	Número de onda (cm ⁻¹) - Literatura	Assinatura
964	950-970	Estiramento da ligação CC do esqueleto (DNA)
1016	1010-1020	Vibrações das ligações da furanose (DNA)
1053	1044-1069	Estiramento da ligação CO no esqueleto (DNA)
1075	1050-1200	Grupo tri-carbonil (DNA)
1087	1085-1090	Estiramento simétrico das ligações PO ₂ ⁻ (DNA)
1178	1183	Ligação açúcar/fosfato na forma A (DNA)
1225	1225-1220	Estiramento assimétrico da ligação PO ₂ ⁻ na forma-B (DNA)
1248	1235-1245	Estiramento assimétrico da ligação PO ₂ ⁻ na forma-A (DNA)
1280	1281 1275	Vibrações da ligação C ₅ =C ₆ da citosina Torção da ligação CN ₃ H da timidina (DNA)
1297	1285-1297	Estiramento da ligação C ₄ NH ₂ da citosina (DNA)
1356	1344	Vibração da ligação N ₇ C ₈ H de dA in C2'-endo/anti (DNA)
1380	1369-1381 1350-1380	Citosina e guanina em anti-conformação (DNA) Formação de Nitroso
1392	1369-1381 1374-1389	Citosina e guanina em anti-conformação (DNA) Estiramento simétrico com deformação da ligação CH ₃ da timidina
1418	1420-1425	Extremidade C ₃ ' da desoxirribose na forma-A (DNA) Extremidade C ₃ ' da desoxirribose na forma-Z (DNA)
1446	1453-1457 1434-1438	Adenina na forma A ou B (DNA) Adenina na forma Z (DNA)
1489	1476-1495	Vibrações do anel das adeninas e guaninas (DNA) Torção da ligação N ₇ C ₈ H da adenina e guanina (DNA)
1531	1520-1527 1530	Vibrações no plano do anel de citosina de cadeia simples ou dupla Vibrações das ligações C no plano (DNA)
1575	1575-1590 1585	Vibrações da ligação C=N do anel da guanina em cadeia simples ou dupla (DNA)
1600	1601	Vibrações da ligação C=N do anel da guanina (DNA)
1657	1655-1657	Estiramento da ligação C ₂ =O ₂ da citosina de cadeia simples ou dupla
1703	1691-1698	Estiramento da ligação C ₂ =O ₂ da timina de cadeia simples ou dupla
1715	1715 1712	Estiramento da ligação C ₂ =O ₂ da guanina em forma de Hoogsteen da terceira cadeia (DNA) Estiramento da ligação C ₂ =O ₂ da timina em forma de Hoogsteen da terceira cadeia (DNA)

Tabela 7 - Principais bandas observadas no espectro de absorção na região do infravermelho de 2,2'-Bipyridyl e respectivas assinaturas espectrais (55) (56) (14)

Número de onda (cm ⁻¹)	Assinatura
990	Ring breathing
1023	Vibração Angular fora do plano do anel de H
1374	Estiramento do anel
1410	Estiramento do anel e vibração angular do anel de H
1534	Estiramento do anel (C=N e C=C)

5.2 Caracterização do efeito de irradiação.

Na **Figura 17 a) e b)** encontra-se representada a evolução dos espectros de absorção de infravermelho, sem e com irradiação, no intervalo de 900 a 1400 cm⁻¹., de filmes de [1:1] (v/v) DNA+2,2'-Bipyridyl. Os filmes foram obtidos por derramamento das soluções aquosas que foram irradiadas durante diferentes intervalos de tempo.

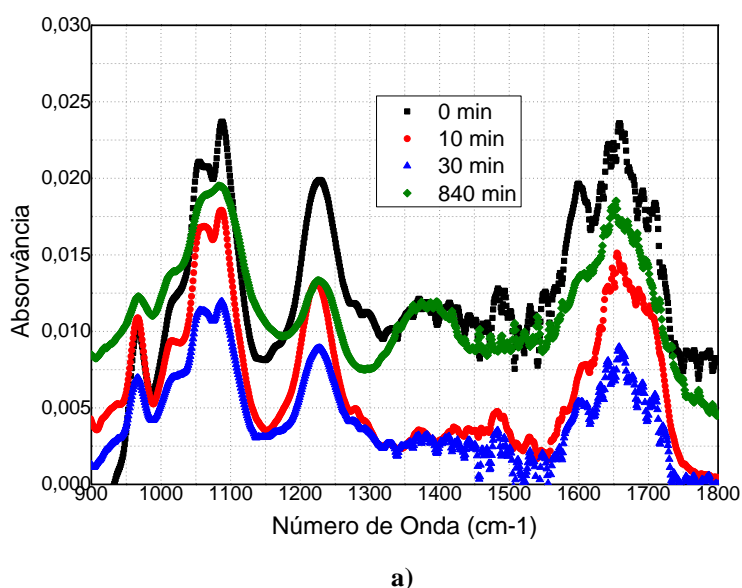
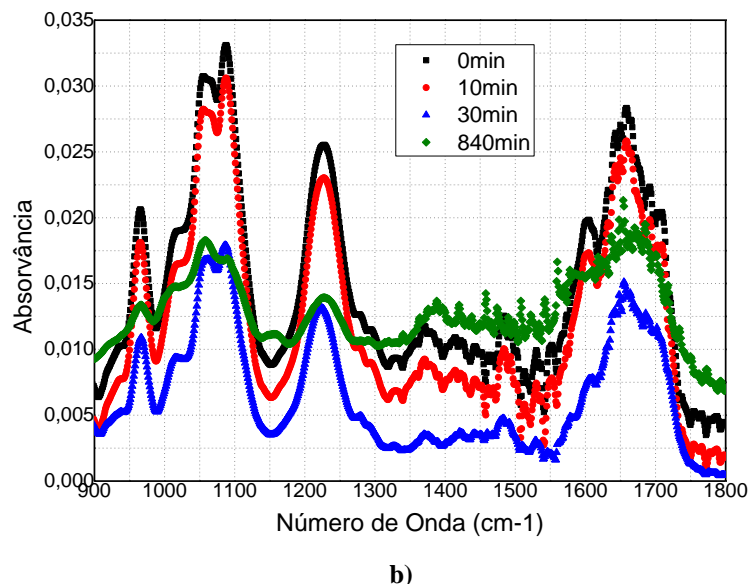
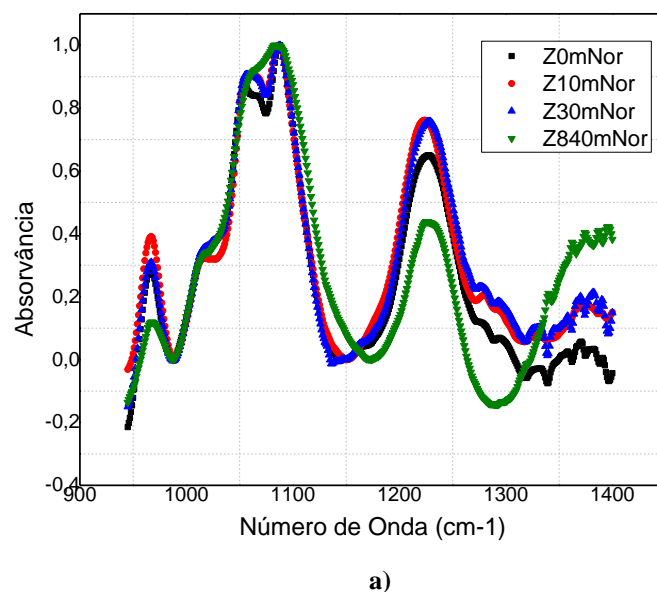


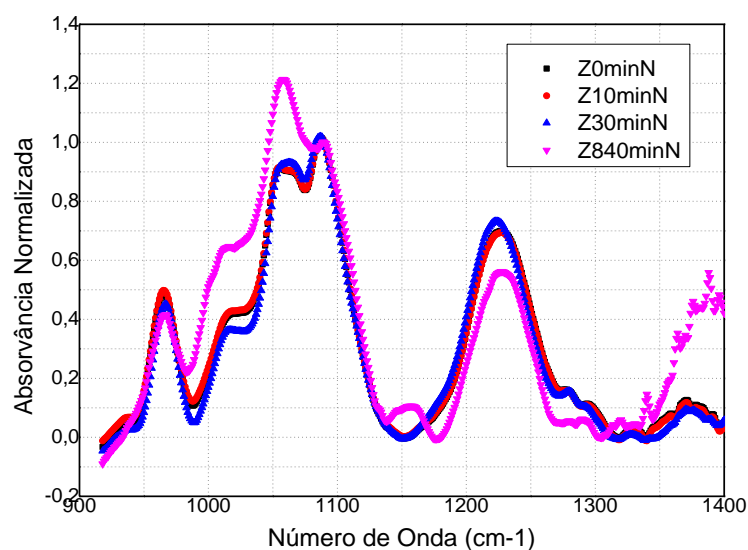
Figura 17 - Espectros de absorção de infravermelho, no intervalo de 900 a 1800 cm⁻¹, de filmes de a) DNA e b) [1:1](v/v) DNA + 2,2'-Bipyridyl preparados a partir de soluções irradiadas durante intervalos de tempo diferentes.



Uma vez que os filmes foram preparados a partir de soluções diferentes por derramamento apresentam espessuras e quantidade de DNA e/ou de *2,2'-Bipyridyl* diferentes e, portanto, os espectros precisam de ser normalizados para se poder concluir sobre os dados obtidos. Assim, o espectros de DNA foram normalizados para o pico a 1087 cm^{-1} depois da linha de base dos espectros ter sido retirada. Por forma a simplificar a análise do espectro, este foi dividido em dois intervalos, de 900 a 1400 cm^{-1} e de 1400 a 1800 cm^{-1} . Primeiramente procederemos à análise do primeiro intervalo (**Figura 18**) e posteriormente ao segundo (**Figura 23**).

Na **Figura 18 a)** e **b)** encontra-se representada a evolução dos espectros de absorção de infravermelho, normalizados para o pico de 1087 cm^{-1} no intervalo de 900 a 1400 cm^{-1} , obtidos para soluções de DNA e $[1:1](v/v)$ DNA+*2,2'-Bipyridyl*, respetivamente, irradiadas durante intervalos de tempo diferentes.

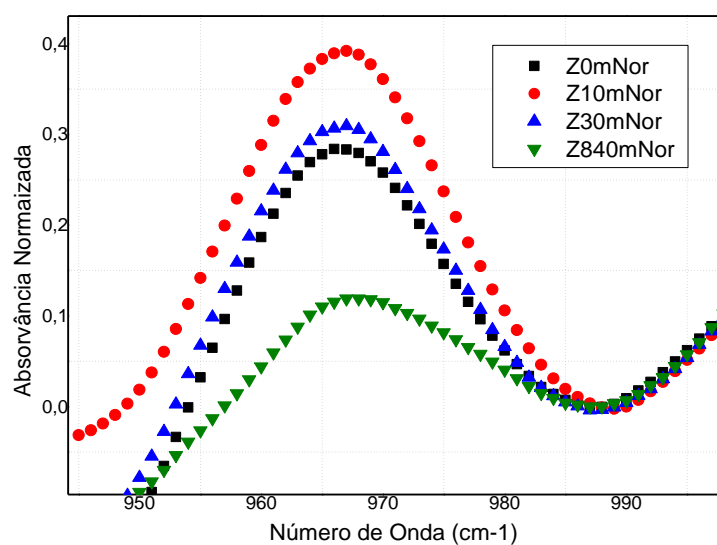




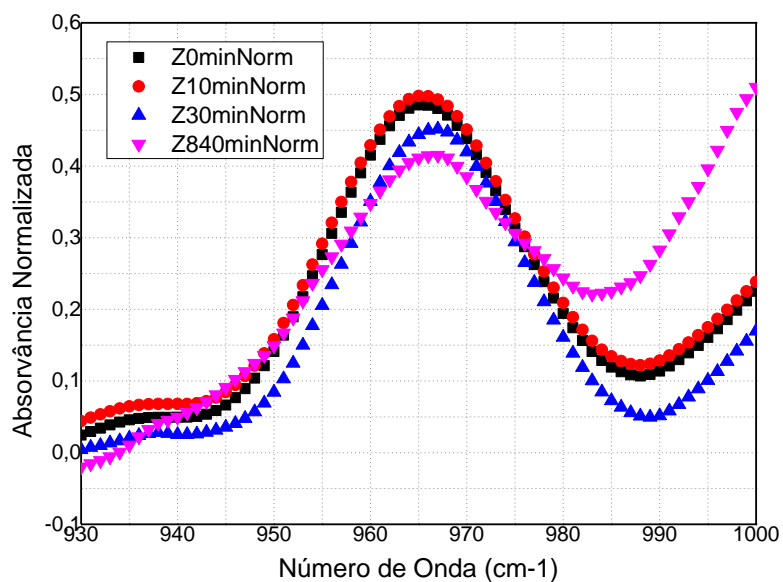
b)

Figura 18 - Espectros de absorção de infravermelho, no intervalo de 900 a 1400 cm^{-1} de filmes de a) DNA e b) $[1:1](v/v)\text{DNA}+2,2'\text{-Bipyridyl}$ preparados a partir de soluções irradiadas durante intervalos de tempo diferentes.

A partir das Figuras **18 a) e b)** verifica-se que a danificação no DNA ocorre nos fosfatos e açúcares. Por forma a proceder a uma análise mais detalhada dos danos causados ao DNA, pela exposição à radiação, analisar-se-á os espectros por pico característico. Assim relativamente à evolução do pico de 960 cm^{-1} obtém-se o espectro presente na **Figura 19 a) e b)**, respetivamente para os filmes de DNA e de $[1:1](v/v)\text{DNA} + 2,2'\text{-Bipyridyl}$. Estas figuras mostram que a absorvância a 960 cm^{-1} decresce com o aumento do tempo de irradiação da solução à radiação UV. Sendo o pico de 960 cm^{-1} identificado, através da literatura, como estando associado ao estiramento da ligação CC do esqueleto do DNA (51) e, portanto, relacionada com as vibrações do anel do açúcar, que a radiação com comprimento de onda a 254 nm é suficiente para romper os anéis de açúcar. No entanto, em presença do $2,2'\text{-Bipyridyl}$ verifica-se que o decaimento não é tão efetivo permitindo concluir que esta molécula intercalante também se deposita ao longo do *backbone* funcionando de proteção à radiação.



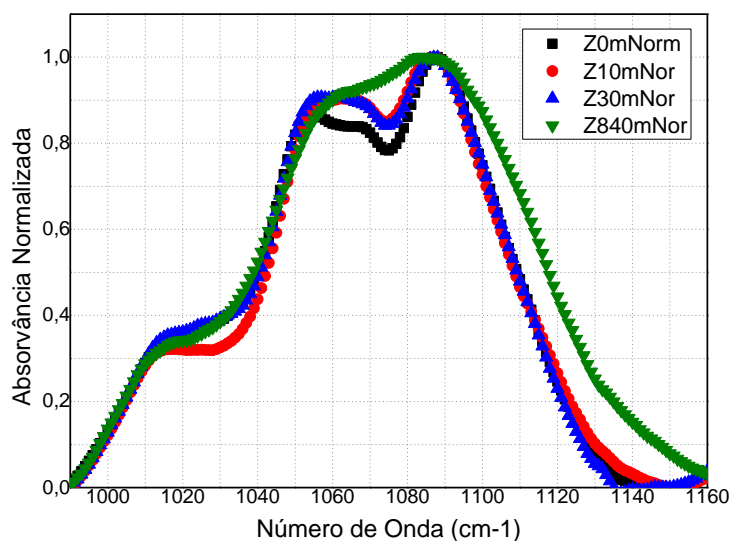
a)



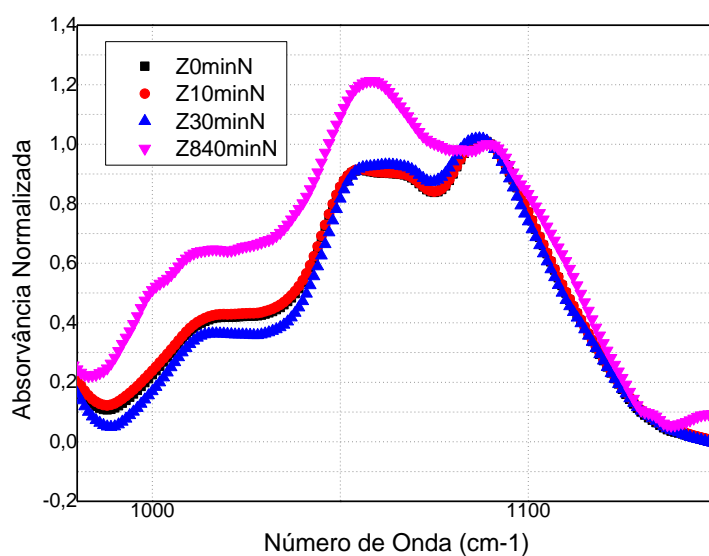
b)

Figura 19 - Evoluções do pico de 960 cm^{-1} dos espectros de absorção de infravermelho normalizados de filmes de a) DNA e b) $[1:1](v/v)$ DNA + 2,2'-Bipyridyl preparados a partir de soluções irradiadas durante intervalos de tempo diferentes.

Por forma a se analisar mais detalhadamente a evolução do espectro no intervalo de 1000 a 1150 cm^{-1} , associado ao 'backbone' (53), obteve-se os espectros da **Figura 20 a) e b)**, respetivamente para os filmes de DNA e de $[1:1](v/v)$ DNA + 2,2'-Bipyridyl.



a)



b)

Figura 20 - Espectros de absorção de infravermelho normalizados, no intervalo de 980 a 1150 cm^{-1} , de filmes de a) DNA e b) $[1:1](v/v)$ DNA + 2,2'-Bipyridyl preparados a partir de soluções irradiadas durante intervalos de tempo diferentes.

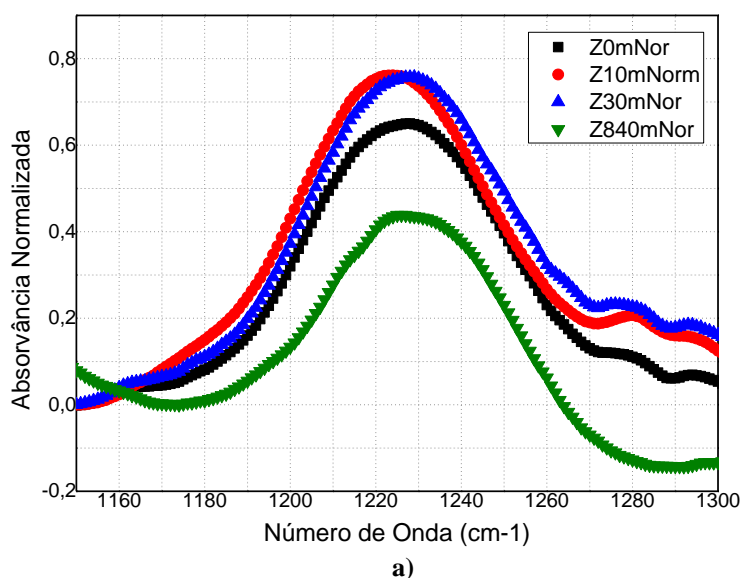
A **Figura 20 a)** evidencia essencialmente que a forma do espectro muda, nomeadamente aumentando a absorvância a 1075 cm^{-1} na molécula de DNA, sendo que esta é associada, na literatura, ao grupo tri-carbonil. (55) No entanto, pode-se também observar que a banda a cerca de

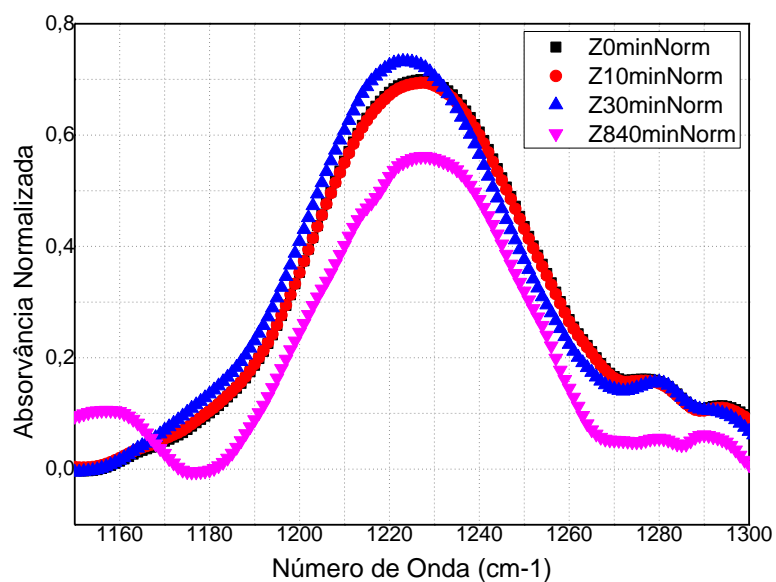
$1015\pm 1\text{ cm}^{-1}$, que está associada a vibrações ligações da furanose do DNA (51), revela pouca variação de absorvância normalizada com o tempo de exposição à radiação UV, o que nos permite inferir que a radiação UV não provoca alterações relativas nesta componente do DNA.

Semelhantes conclusões são retiradas através da análise dos picos a cerca de $1054\pm 1\text{ cm}^{-1}$ e $1087\pm 1\text{ cm}^{-1}$ e que estão associados na literatura ao estiramento da ligação CO no esqueleto e estiramento simétrico das ligações PO_2^- , respetivamente, sendo assim possível inferir que não ocorreram variações relativas nestas duas componentes do DNA. (51) No entanto, deve ser referido que a irradiação de DNA leva a perda dos grupos fosfatos, tal como foi mencionado anteriormente (51) e, portanto espera-se um decaimento exponencial destes grupos.

Através da análise do gráfico da **Figura 20 b)** é possível verificar que o a banda de 1075 cm^{-1} , associada na literatura ao grupo tri-carbonil, (57) não sofre variações relativas, na presença do 2,2'-Bipyridyl, com o aumento do tempo de exposição à radiação. No entanto, é possível verificar que a banda de $1058\pm 1\text{ cm}^{-1}$, associada na literatura ao estiramento da ligação CO no esqueleto (51), e a banda de $1087\pm 1\text{ cm}^{-1}$, associada ao estiramento simétrico das ligações de PO_2^- (51) sofrem alterações. No caso das bandas de $1058\pm 1\text{ cm}^{-1}$ é possível se verificar um aumento da absorvância nesta banda com o aumento do tempo de exposição à radiação o que indica a formação de ligações C-O. Por outro lado, no caso das bandas de $1087\pm 1\text{ cm}^{-1}$, não é possível concluir acerca de como se dá o seu decaimento com o aumento do tempo de exposição à radiação.

As conclusões anteriores são corroboradas através das **Figura 21 a) e b)**, onde é possível observar especificamente a evolução do espectro no intervalo de número de onda de 1150 a 1300 cm^{-1} , de filmes de DNA e $[1:1](v/v)\text{ DNA} + 2,2'\text{-Bipyridyl}$, respetivamente, preparados a partir de soluções irradiadas durante intervalos de tempo diferentes, por forma a analisar mais detalhadamente a evolução do pico a cerca de $1225\pm 1\text{ cm}^{-1}$, cujo pico se encontra associado na literatura ao grupo fosfatos. (58) Deve ser referido que a irradiação de DNA leva a perda dos grupos fosfatos, tal como foi mencionado anteriormente (51) e, portanto conclui-se que se dá um decaimento exponencial destes grupos. Por outro lado, na presença de 2,2'-Bipyridyl, **Figura 21 b)**, tal comportamento também se verifica no entanto com melhor intensidade, sendo assim possível inferir que ocorre uma maior perda dos grupos fosfatos na ausência do intercalante do que na presença, uma vez que o pico está associado na literatura ao estiramento assimétrico da ligação PO_2^- na forma-B do DNA (54).

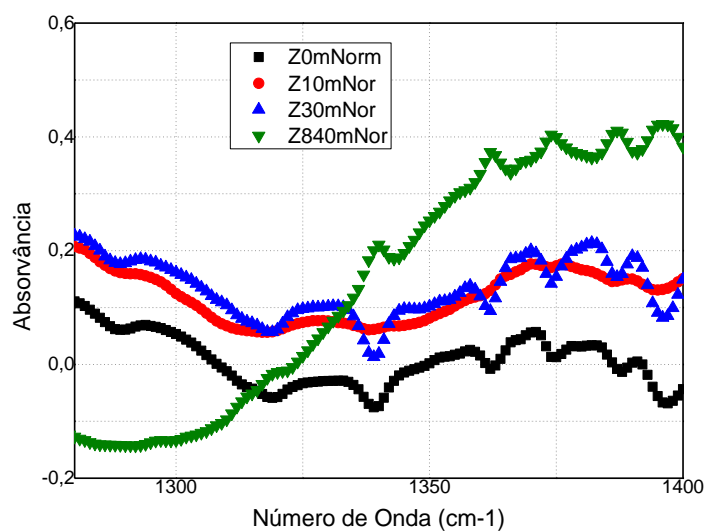




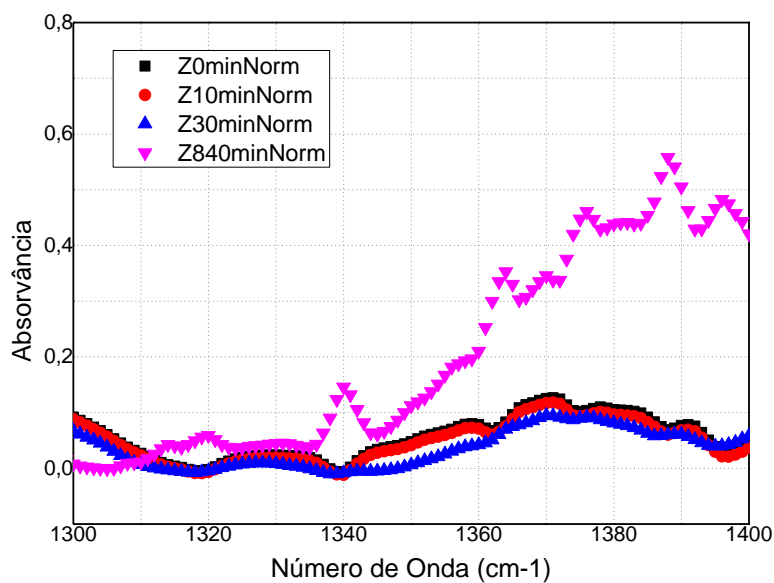
b)

Figura 21 - Espectros de absorção de infravermelho normalizados, no intervalo de 1150 a 1300 cm^{-1} , de filmes de a) DNA e b) $[1:1](v/v)$ DNA + 2,2'-Bipyridyl preparados a partir de soluções irradiadas durante intervalos de tempo diferentes.

Posteriormente foi traçado o espectro no intervalo de 1300 a 1400 cm^{-1} , **Figura 22 a) e b)**, onde é possível observar, especificamente a evolução do espectro na região do número de onda a cerca de $1380 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, respetivamente para os filmes de DNA e de $[1:1](v/v)$ DNA + 2,2'-Bipyridyl, preparados a partir de soluções irradiadas durante intervalos de tempo diferentes.



a)

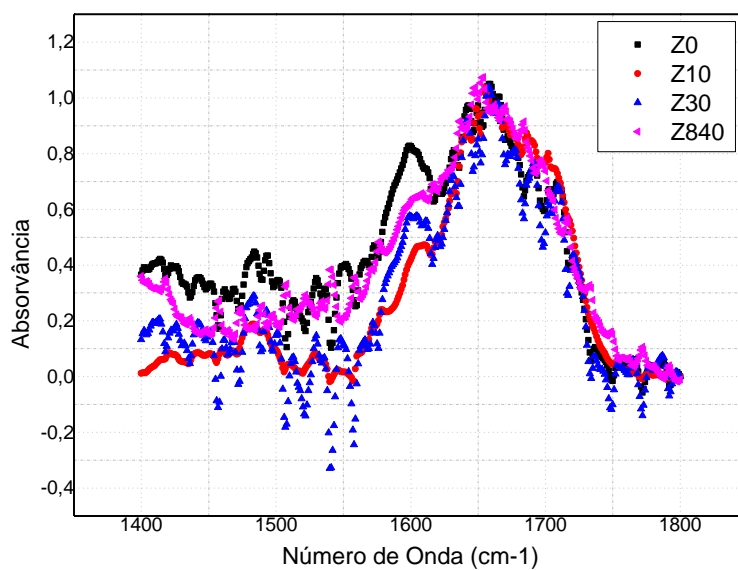


b)

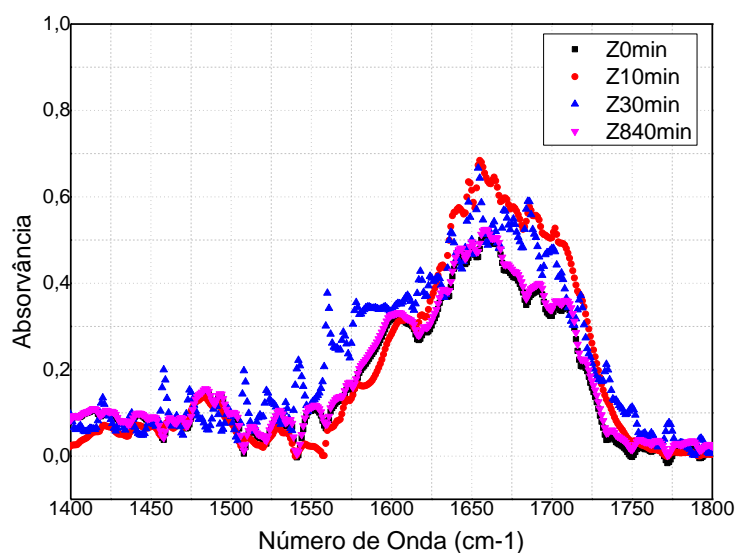
Figura 22 -Espectros de absorção de infravermelho normalizados, no intervalo de 1250 a 1400 cm^{-1} , de filmes de a) DNA e b) $[1:1](v/v)$ DNA + 2,2'-Bipyridyl preparados a partir de soluções irradiadas durante intervalos de tempo diferentes.

Apesar de o espectro neste intervalo apresentar algum ruído, é possível observar (**Figura 22 a) e b)**) que nesta banda a absorvância do espectro aumenta com a evolução do tempo de exposição do DNA à radiação UV. Esta banda é associada, na literatura, a mudanças de conformação das purinas - citosina e guanina (no intervalo de 1369 a 1381 cm^{-1}) (54). Mudanças de conformação poderiam levar a um aumento de absorvância mas um aumento tão elevado só poderá ser explicado pela formação de novas ligações. A formação de nitroso cujas assinaturas se encontram a 1350 e 1530 cm^{-1} (55), pode ser uma possível explicação para o aparecimento desta banda. Na presença de 2,2'-Bipyridyl (**Figura 22 a)**), observa-se um aumento da absorvância desta banda relativamente ao espectro sem a sua presença (**Figura 22 b)**).

Na **Figura 23 a) e b)**, encontra-se representada a evolução dos espectros de absorção de infravermelho, no intervalo de 1400 a 1800 cm^{-1} , respetivamente para os filmes de DNA e de $[1:1](v/v)$ DNA + 2,2'-Bipyridyl, preparados a partir de soluções irradiadas durante intervalos de tempo diferentes.



a)



b)

Figura 23 - Evolução do espectro no intervalo de número de onda de 1400 a 1800 cm^{-1} de filmes de a) DNA e b) $[1:1](v/v)$ DNA + 2,2'-Bipyridyl preparados a partir de soluções irradiadas durante intervalos de tempo diferentes.

Tal como evidenciado na **Tabela 6**, este intervalo de número de onda está maioritariamente associado às bases do DNA. Mas, analisando os gráfico das **Figura 23 a) e b)**, respetivamente para os filmes de DNA e de $[1:1](v/v)$ DNA + 2,2'-Bipyridyl, é possível inferir que o espectro apresenta muito ruído dificultando identificar claramente picos característicos e variações relativas neste intervalo de número de onda.

5.3 Conclusões

Os filmes finos de DNA e 2,2'-Bipyridyl e [1:1](v/v) DNA + 2,2'-Bipyridyl, preparados a partir de soluções irradiadas durante intervalos de tempo diferentes foram caracterizadas por espectrofotometria de infravermelho, tendo sido analisado o comportamento de cada um dos espectros.

Verificou-se que a danificação no DNA ocorre nos fosfatos e açúcares. No caso dos açúcares a radiação é suficiente para romper os anéis de açúcar, no entanto, em presença de 2,2'-Bipyridyl verificou-se que o decaimento da absorvância não é efetivo, permitindo assim concluir que este intercalante também se deposita ao longo do *backbone*, funcionando como proteção da radiação.

Relativamente ao grupo tri-carbonil foi verificado que a absorvância na banda característica desta componente do DNA aumenta, e não sofre alterações relativas na presença do intercalante 2,2'-Bipyridil. Por outro lado, não se verificaram alterações relativas à furanose, à ligação CO no esqueleto do DNA e nas ligações PO_2^- quando o DNA é exposto à radiação; no entanto, na presença do 2,2'-Bipyridyl, observou-se um aumento da absorvância no caso da ligação CO no esqueleto do DNA e no caso das ligações de PO_2^- verificou-se um comportamento oposto, a absorvância diminui.

Estas conclusões foram corroboradas pela análise da banda característica do grupo fosfatos, verificando-se uma diminuição da absorvância desta banda, ou seja, uma perda destes grupos quer na ausência quer na presença do intercalante, no entanto na presença essa perda é inferior.

Também foi possível verificar a possibilidade de formação de nitroso e mudanças de conformação das purinas através do aumento da absorvância da banda associada a tais componentes. Tal comportamento verificou-se quer na ausência, quer na presença do intercalante aquando irradiação, no entanto quando o intercalante está presente a absorvância desta banda é superior.

Relativamente à região das bases, foi possível observar um aumento da absorvância quer na presença ou na ausência do intercalante, no entanto devido ao grande ruído dos espectros obtidos nesta região não foi possível fazer uma análise mais detalhada do comportamento na ausência e na presença do intercalante.



Conclusão

Neste trabalho foram estudados os danos induzidos no DNA por radiação ultravioleta em presença do agente intercalante *2,2'-Bipyridil*. Os danos criados no DNA foram analisados pelas técnicas de espectroscopia de ultravioleta-visível e de infravermelho.

As soluções aquosas de DNA, *2,2'-Bipyridyl* e $[1:1](v/v)$ DNA + *2,2'-Bipyridyl* foram caracterizadas por espectrofotometria, tendo sido atribuídas as respectivas transições eletrônicas às bandas encontradas. A evolução da absorvância a 260 e 280 nm revelou que a presença do *2,2'-Bipyridyl* acentua a degradação do DNA e que acentua ainda mais o decaimento da guanina. Estes resultados permitem assim concluir que este intercalante pode ajudar a degradar a molécula de DNA.

Os resultados de cinética de criação de danos permitiram inferir que a cinética de degradação do DNA é mais eficiente na presença do composto *2,2'-Bipyridil* e que o ataque pelos produtos da decomposição do é feito *2,2'-Bipyridil* a todas as bases, embora com constantes características diferentes, sendo a ataque à guanina com uma constante de tempo maior.

A caracterização por infravermelho permitiu identificar que a presença do *2,2'-Bipyridil* contribui para acentuar o efeito de danificação nas diferentes componentes do DNA embora em algumas situações possa ter o efeito de proteção como no caso dos açúcares.

Estes resultados permitem concluir que este composto pode ser um possível candidato a indutor de lesões no DNA.

Trabalhos Futuros

Do ponto de vista de trabalho futuro pretende-se estudar o efeito da radiação UV em filmes de *2,2'-Bipyridil* e DNA em diferentes condições de atmosfera, temperatura, humidade e iluminação. A ausência de luz ambiente, a ausência de oxigénio em sistemas de alto-vácuo e a presença saturada de água e oxigénio, são certamente condições que podem influenciar os resultados. Pretende-se preparar filmes automontados de *2,2'-Bipyridil* e de DNA com um número elevado de bicamadas, de modo a poderem ser analisados por espectroscopia de absorção de infravermelho. Estes filmes devem ainda ser caracterizados por outras técnicas de análise tais como espectroscopia de fluorescência, após um estudo aprofundado da interação entre *2,2'-Bipyridil* e DNA deverão ser efetuados, estudos comparativos com outras drogas fotossensibilizadoras.



Bibliografia

1. **Watson, J.D. e Crick, F.H.C.** *Nature*. 1953. pp. 964-967. Vol. 171.
2. **Wheate, N.J., et al.** *DNA Intercalators in Cancer Therapy: Organic and Inorganic Drugs and Their Spectroscopic Tools of Analysis*. s.l. : Mini-Reviews in Medicinal Chemistry , 2007. pp. 627-648. Vol. 7.
3. **Thompson, J. F.** *Basics of Oncology*. New York : Springer, 2009.
4. **Lerman, L.S.** *Journal of Molecular Biology*. 1961. p. 18. Vol. 3.
5. **Martinez, R. e Chacon-Garcia, L.** *Current Medicinal Chemistry*. 2005, Vol. 12, pp. 127-151.
6. **Brown, S.B., Brown, E.A. e Walker, I.** *Lancet Oncology*. 2004, Vol. 5, pp. 497-508.
7. **Coelho, M.** *Estudo do efeito da Radiação UV em filmes de ADN com intercalante*. Lisboa : Engenharia Biomédica, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa, 2008.
8. **Rocha, C.** *Lesões inteligentes em DNA*. s.l. : Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa, 2011.
9. **Neto, Brenno e Lapis, Alexandre.** *Recent Developments in the Chemistry of Deoxyribonucleic Acid (DNA) Intercalators: Principles, Design, Synthesis, Applications and Trends*. Brazil : s.n., 2009. ISSN 1420-3049.
10. **Ravanat, J.L., Ponki, T. e Cadet, J.** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2001. Vol. 63, pp. 88-102.
11. **Willy J. M., (Ph.D).** *Ultraviolet Light in Water and Wastewater*. E.U.A. : LEWIS PUBLISHERS, 2002.
12. **Mota, C.** *Desenvolvimento de um sistema para irradiação por ultravioleta de biomoléculas*. s.l. : Faculdade de Ciências e Tecnologias, 2011.
13. **Duarte, A.** *Espectroscopia Vibracional - Infravermelho (IV)*. s.l. : FCT-UNL.
14. **Strukl, J.S. e Walter, J.L.** *Spectrochimica Acta*. 1971. pp. 27, 209.
15. **Masschelein, W.J.** *Ultraviolet Light in Water and Wastewater Sanitation*. United States of America : Lewis Publishers, 2002.
16. **Raab, O. Z. Biol.** 39. 1991. p. 529.

17. **Setlow, R.B.** The wavelenghts in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis. s.l. : Proc Natl Acad, 1974 Sep, p. 71(9).
18. **Philips.** *UV Disinfection - Application Information; Perfection Preserved by the purest of light.* 2004.
19. **Pfeifer GP, You YH, Besaratinia A.** Mutations induced by ultraviolet light. . *Mutat Res.* 2005 Apr 1, Vols. 571 (1-2), pp. 19-31.
20. **Gad, F., et al.** *Antimicrobial Agents and Chemoteraphy.* 2004. pp. 497-508. Vol. 48.
21. **Pattison, D.I. e Davies, M.J.** Cancer: Cell Structures, Carcinogens and Genomic Instability. 2006, Vol. 96, pp. 131-157.
22. **Silverstein, R.M., Bassier, G.C. e Morrill, T.C.** Spectrometric identification of organic compounds. s.l. : John Wileys & Sons.
23. **Robertson, C. a, Evans, D. H. & Abrahamse, H.** *Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT.* s.l. : Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology, 2009. pp. 1-8. Vol. 96.
24. **Hendrickx, N.** *Mechanism and Role of Cyclooxygenase-2 Up-Regulation by Photodynamic Therapy.* s.l. : Leuven University Press, 2006. pp. 1-30.
25. **Yano, S. et al.** *Current states and future views in photodynamic therapy.* s.l. : Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews, 2011. pp. 46-67. Vol. 12.
26. **Bass, P., Schellens, J.H.M. & tewart, F.** *Phtdynamic therapy in ncology.* s.l. : The oncologist, 2006. pp. 1034-44. Vol. 11.
27. **Josefsen, L.B. & Boyle, R.W.** *Photodynamic therapy and the development f metal-based photosensitisers.* s.l. : Metal-based drugs, 2008. p. 276109.
28. **Cló, E., Snyder, J. W., Ogilby, P. R. & Gothelf, K. V.** *Control and selectivity of photosensitized singlet oxygen production: challenges in complex biological systems.* s.l. : Chembiochem : a European journal of chemical biology, 2007. pp. 475-81. Vol. 8.
29. **Konan, Y. N., Gurny, R. & Allémann, E.** *State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy.* s.l. : Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology, 2002. pp. 89-106. Vol. 66.
30. **Solomons, G. e Fryhle, C.** *Organic Chemistry.* s.l. : John Wiley & Sons, 2004. pp. 64-66.
31. **So R., Alavi S.** *J.Comp Chem.* 2007. pp. 1776-82. Vol. 28.
32. **Sinha, R., et al.** Maiti, M.M Bioorganic & Medical Chemistry. 2006, Vol. 14, pp. 800-814.
33. **Schuch, A.** *Avaliação da ação genotóxica induzida pela radiação ultravioleta solar na molécula de DNA.* São Paulo : USP, 2009.
34. **Shukla MK, Leszczynski J.** *J. Comp Chem.* 2004. pp. 768-78. Vol. 25.
35. **Runger TM, Kappes UP.** Mechanisms of mutation formation with long-wave ultraviolet light (UVA). *Photodermatol Prhotoimmunot Photomed.* Feb de 2008, Vol. 24(1), pp. 2-10.
36. **Ruddon, R. W.** *Cancer Biology.* New York : Oxford University Press:, 2007.
37. **Roca-Sanjuán D., Rubio M, Merchán M., Serrano-Andrés L.** *J Chem Phys.* 2006. Vol. 125; 084302.

38. **Perdiz D, Grof P, Mezzina M, Nikaido O, Moustacchi E, Sage E.** Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible Role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis. *J Biol Chem.* 2000 Sep 1. Vol. 275(35), p. 2.
39. **Kielbassa, C., Roza, I e Epe, B.** Carcinogenesis. 1997. Vol. 18, pp. 811-816.
40. **Luis, D.** *Caracterização do efeito anti-tumoral de complexos organometálicos contendo 1,10-fenantrolina-5,6-diona.* s.l. : FCT-UNL, 2011.
41. **Martins, L.** *Intercalantes de ADN: Interação e ação na degradação por radiação UV.* s.l. : FCT-UNL, 2010. Research Fellowship Report from Feb.2009 to Jan.2010, at CEFITEC/Line 3.
42. **Griesbeck, A. et al.** *CRC Handbook Organic Photochemistry and Photobiology.* 3. s.l. : CRC Press, Tylor & Francis Group. Vol. 1.
43. Datasheet da Lâmpada Philips TUV PL-S 5W/2P 1CT.
44. **Vollhardt, K.P.C. and N.E.Schore.** *Organic Chemistry - Structure and Function.* United States of America : 4th , 2002.
45. **Sinha, R., et al.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2006. pp. 800-814. Vol. 14.
46. **Costa, Ana M.** *Caracterização de filmes finos de Adenina e Timina por Radiação UV-Visível .* Lisboa : in Engenharia Biomédica, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa, 2007.
47. **Song JM, Miligan JR, Sutherland BM,.** Bistranded oxidized purine damage clusters: induce in DNA by longwavelength ultraviolet (290-400nm) radiation . *Biochemistry.* 2002 Jul 9, Vol. 41(27), pp. 8683-8.
48. **Monteiro, A.** *Estudo da Dinâmica da criação e da relaxação de birrefringência fotoinduzida em filmes automontados de PAH/PAZO.* s.l. : Faculdade de Ciências e Tecnologias, UNL, 2013.
49. (08/03/2014).
http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/data/Journals/BIOMEDO/24226/JBO_17_10_1050_01_f002.png.
50. **Isaacson, M.J.** *J Chem Phys.* 1972. pp. 1803-12. Vol. 56.
51. **Gomes, P, et al.** *UV degradation of deoxyribonucleic acid.* s.l. : Polymer Degradation and Stability, Elsevier, Dec 2009. Vol. 94. 2134-2141.
52. **Cantor, C.R. e Schimmel, P.R.** *Biophysical chemistry: part II, Techniques for the study of biological structure and function .* New York : W.K.Freeman and Company, 1980.
53. **Kumar, Subodh.** *Organic Chemistry - Spectroscopy of organic compounds.* s.l. : Guru Nanak Dev University, 2006. Amritsar -143005.
54. **Banyay, M., Sarkar, M. e Graslund, A.** *Biophysical Chemistry.* 2003. p. 477. Vol. 104.
55. **Reusch, William.** chemistry.msu.edu. [Online] 5 de Maio de 2013. [Citação: 30 de Março de 2014.]
<http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/InfraRed/infrared.htm>.

56. **Stuart, B.** *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and applications*. Ingraterra : John Wiley & Sons, 2004.
57. **P, Lawley PD & Brooks.** *Biochem.J.* 1963. pp. 127-138. Vol. 89.
58. **Ochsner, M. J.** *Photochem. Photobiol.* . 1997. pp. B39, 1.
59. **You YH, Lee DH, Yoon JH, Nakajima S, Yasui A, Pfeifer GP.** Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVC irradiation in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2001 Nov 30, Vol. 276(48).
60. **Martinez, R and L.Chacón-García.** *The Search of DNA-Intercalators as Antitumoral Drugs: What it Worked and What did nor Work*. s.l. : Current Medicinal Chemistry, 2005. pp. 127-151. Vol. 12.
61. **Mansuri-Torsihizi, H., Ghadimy, S. e Akbarzadeh, N.** *Chemical & Phamaceutical Bulletin.* 2001, Vol. 49, pp. 1517-1520.
62. **Kundo, L.M.** *Investigation of UVC induced DNA damage formation and photolyase catalysed rapair of cyclobutane pyrimidine dimers*. Hooghly, West Bengal, India : s.n., 2005.
63. **Kowalski, W.** *Ultraviolet Germicidal Irradiation Handbook*. s.l. : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009.
64. **Jemal, A., Bray, F. & Ferlay, J.** Global Cancer Statistics. 2011, Vols. 61, pp. 69–90.
65. **Jemal, A. et al.** *CA Cancer J Clin.* 2009. pp. 225-249. Vol. 59.
66. **J.M., Willy.** (Ph.D) *Ultraviolet Light in Water and Wastewater*. U.S.A. : Lewis Publishers, 2002.
67.
<http://www.photobiology.com/photoiupac2000/pierard/Interactionmain.html#anchor1012623>. *Interaction of Ru(II) Complexes and DNA*. 2011.
68. **Gruijl, F.R.d. and H.Ananthaswamy,.** Introduction to special issue on “Biologic Effects of UV Radiation”. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2005, p. 571.
69. **Freeman SE, Hacham H, Gange RW, Maytum DJ, Sutherland JC, Sutherland BM.** Wavelength depedence of pirimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light. [ed.] *Proc Natl Acad Sci USA*. Jul de 1989 , Vol. 86 (14), pp. 5605-9.
70. **de Lima- Bessa KM, Armelini MG, Chigancas V, Jacysyn JF, Amarante-Mendes GP, Sarasin A, et al.** CPDs and &-4PPS play different roles in UV-induced cell death in normal and NER-deficient human cells . 2008 Feb 1. Vol. 7(2), pp. 303-12.
71. **Darr D, Fridovish I.** Free radicals in cutaneous biology. *J Invest Dermatol.* 1994 May, Vol. 102 (5), pp. 671-5.
72. **Corrêa, M. P.** *Índice ultravioleta: avaliações e aplicações*. São Paulo, Brasil : s.n., Junho 2003.
73. **Coolhill, T.P., Peak, M.J. e Peak, J.B.** The effects of the ultraviolet wavelenghts of radiation present in sunlight on human cells in vitro. *Photochemistry and Photobiology*. 1987, pp. 1043 - 1050.
74. **Campos, L. S.** *Entender a Bioquímica*. Lisboa : 4ªed. Escolar Editora., 2005.

75. **Britt, A. B.** *Repair of DNA Damage Induced by Ultraviolet Radiation, Section of Plant Biology*. University of California. Davis, California : s.n., 1995.
76. **Borin AC, Serrano-Andrés L, Fülcher MP, Roos BO.** *J Phys Chem A*. 1999. pp. 1838-45. Vol. 103.
77. **Berg, J.M. e Stryer, J.L. Tymoczko and L.** *Biochemistry (5th Edition)*. New York : Freeman, 2002.
78. **Batista LF, Kaina B, Meneghini R, Menck CF.** How DNA lesions are turned into powerfull killing structures:insights from UV-induced apoptosis. *Mutat Res*. 2009 Mar-Jun. Vols. 681(2-3), pp. 197-208.
79. **Alexandre, F. et al.** *Avaliação da eficiência da radiação ultravioleta na esterilização de embalagens plásticas*. Brasil : s.n., 2008.
80. **Teixeira Dias, J.J.C.** *Espectroscopia Molecular* . s.l. : Fundação Calouste Gulbenkian .
81. **ACGIH.** *Threshold Limit Values*. 1999-2000.
82. http://prolight.info/pdf_specs/Philips_UV_tech_brochure.pdf. [Online]
83. **Tardivo, J., et al.** *Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications*. s.l. : Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2005. pp. 175-191. Vol. 2.
84. **Goodman, L.S., et al.** *Journal of the American Medical Association*. 1946. pp. 126-132. Vol. 132.
85. **Kalka, K., Merk, H. e Mukhtar, H.** *Photodynamic therapy in dermatology*. s.l. : Journal of American Academy if Dermatology, 2000. pp. 380-413.
86. **Kuluncsis Z, Perdiz D, Brulay E, Muel B, Sage E.** *Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution:involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts.* .; 1999 Mar. pp. 71-80. Vol. 49 (1).
87. **Li, S. et al.** *Stacking Interations and DNA Intercalation*. 2009. pp. 11166-11172. Vol. 113.
88. **Montagner, Suelen e Costa, Adilson.** *Molecular basis of photoaging*. s.l. : An Bras Dermatol. 2009;84(3):263-9.
89. **Mouret S, Baudouin C, Charveron M, Favier A, Cadet J, Douki T.** *Cyclebutane pyrimidine dimers are proedominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation*. s.l. : Proc Natl Acad Sci USA, 2006 Sep 12. Vol. 103(37). 13765-70.
90. **Setúbal, C.** *Procura por novos fotossensibilizadores para uso em Terapia Fotodinâmica*. Curitiba, Brasil : Universidade Federal do Paraná, 2007.
91. **Castellucci, E. et al.** *IR and Raman spectra of a 2,2'-Bipyridine single crystal: internal modes*. [ed.] Chemical Physics. Florence Italy : North-Holland Publising Company, 1979. pp. 365-373. Vol. 43.